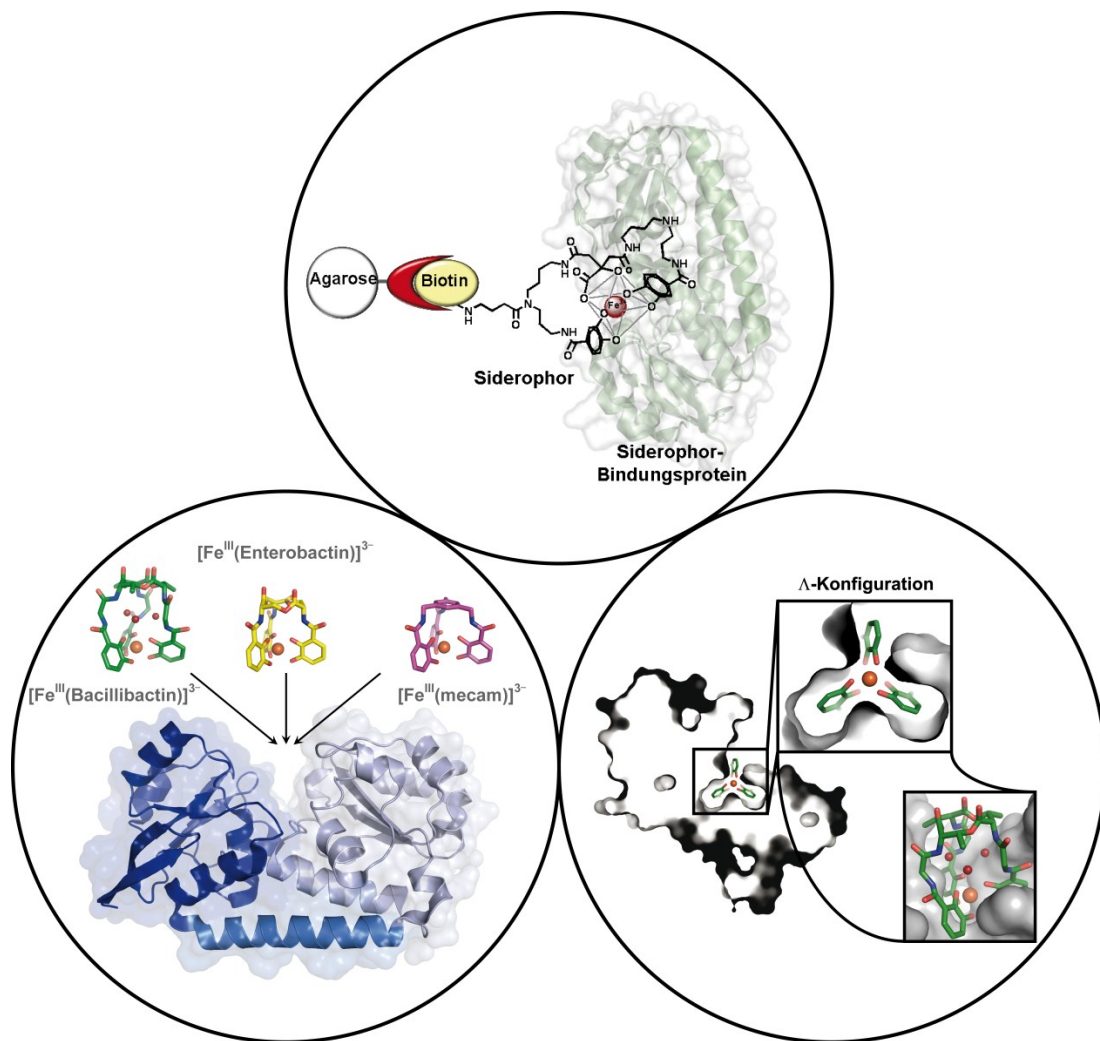


Identifizierung und Charakterisierung von Siderophorbindungsproteinen aus *Bacillus subtilis*

Dissertation

Florian Peuckert



Marburg an der Lahn, 2011

Identifizierung und Charakterisierung von Siderophorbindungsproteinen aus *Bacillus subtilis*

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

dem

**Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg**

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Florian Peuckert
aus Biedenkopf an der Lahn

Marburg an der Lahn, 2011

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 02.05.2011
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe
Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

Tag der Disputation: 05.05.2011

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2007 bis März 2011 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel angefertigt.

Erklärung

gemäß § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.07.2009

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung von Siderophorbindungsproteinen aus *Bacillus subtilis*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient sowie alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 31.03.2011

Florian Peuckert

Der Hauptteil der hier vorgestellten Arbeiten wurde bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Publikationen

Florian Peuckert, Marcus Miethke, Alexander G. Albrecht, Lars-Oliver Essen, Mohamed A. Marahiel
Strukturbasis und Stereochemie der Triscatechol-Siderophor-Bindung durch FeuA
Angew. Chem. **2009**, *121*, 8066–8069;
Structural Basis and Stereochemistry of Triscatecholate Siderophore Binding by FeuA
Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, *48*, 7924–7927.

Nikolas Bugdahn,^[+] **Florian Peuckert**,^[+] Alexander G. Albrecht, Marcus Miethke, Mohamed A. Marahiel, Markus Oberthür
Direkte Identifizierung eines Siderophor-Importproteins durch synthetische Petrobactinliganden
Angew. Chem. **2010**, *122*, 10408–10411;
Direct Identification of a Siderophore Import Protein Using Synthetic Petrobactin Ligands
Angew. Chem. Int. Ed. **2010**, *49*, 10210–10213.

^[+] gleichwertiger Beitrag

Florian Peuckert, Ana Laura Ramos-Vega, Marcus Miethke, Clemens J. Schwörer, Alexander G. Albrecht, Markus Oberthür, Mohamed A. Marahiel
The Siderophore Binding Protein FeuA Shows Limited Promiscuity toward Exogenous Triscatecholates
Chem. Biol. **2011**, *18*, 907–919.
(zur Publikation eingereicht zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit)

weitere Publikationen des Autors

Alexander G. Albrecht, Daili J. A. Netz, Marcus Miethke, Antonio J. Pierik, Olaf Burghaus, **Florian Peuckert**, Roland Lill, Mohamed A. Marahiel

SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*

J. Bacteriol. **2010**, *192*, 1643–1651.

Marcus Miethke, Antonio J. Pierik, **Florian Peuckert**, Andreas Seubert, Mohamed A. Marahiel

Identification and characterization of a novel-type ferric siderophore reductase from a Gram-positive extremophile

J. Biol. Chem. **2011**, *286*, 2245–2260.

Alexander G. Albrecht, **Florian Peuckert**, Hannes Landmann, Marcus Miethke, Andreas Seubert, Mohamed A. Marahiel

Mechanistic characterization of sulfur transfer from cysteine desulfurase SufS to the iron-sulfur scaffold SufU in *Bacillus subtilis*

FEBS Lett. **2011**, *585*, 465–470.

Alexander G. Albrecht, Hannes Landmann, David Nette, Olaf Burghaus, **Florian Peuckert**, Andreas Seubert, Marcus Miethke, Mohamed A. Marahiel

The Frataxin Homologue Fra Plays a Key Role in Intracellular Iron Channeling in *Bacillus subtilis*

ChemBioChem **2011**, *12*, 2052–2061.

(zur Publikation eingereicht zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit)

Tagungsteilnahmen

7th Colloquium of the DFG Priority Program 1152: Evolution of Metabolic Diversity
Halle an der Saale, 03.–04.04.2008

7. International Copper Meeting: Copper in Biology
Alghero, Sardinien, Italien, 16.–21.10.2010

Poster

Marcus Miethke, **Florian Peuckert**, Alexander G. Albrecht, Lars-Oliver Essen, Mohamed A. Marahiel
Insights into ferric siderophore recognition by FeuA and cytosolic iron release
Biometals 2010
Tucson, Arizona, USA, 25.–30.07.2010

Shashi Chillappagari, **Florian Peuckert**, Andreas Seubert, Oscar P. Kuipers, Mohamed A. Marahiel,
and Marcus Miethke
The effect of copper stress on iron metabolism in *Bacillus subtilis*
7. International Copper Meeting: Copper in Biology
Alghero, Sardinien, Italien, 16.–21.10.2010

Strukturkoordinaten

Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der RCSB-Proteindatenbank (www.pdb.org) unter folgenden Eintragungen hinterlegt:

2WI8: Crystal Structure of the Triscatecholate Siderophore Binding Protein FeuA from *Bacillus subtilis*

2WHY: Crystal Structure of the Triscatecholate Siderophore Binding Protein FeuA from *Bacillus subtilis* Complexed with Ferri-Bacillibactin

2XUZ: Crystal Structure of the Triscatecholate Siderophore Binding Protein FeuA from *Bacillus subtilis* Complexed with Ferri-Enterobactin

2XV1: Crystal Structure of the Triscatecholate Siderophore Binding Protein FeuA from *Bacillus subtilis* Complexed with Ferric MECAM

Meiner Familie

Zusammenfassung

Um die Versorgung mit dem essentiellen Spurenelement Eisen sicherzustellen, haben Mikroorganismen eine Vielzahl von Strategien entwickelt. Die Sekretion von niedermolekularen, chelatisierenden Molekülen, den sogenannten Siderophoren, nimmt unter den bakteriellen Eisenakquirierungsstrategien eine besonders prominente Rolle ein. Die Wiederaufnahme der eisenbeladenen Siderophore durch Mikroorganismen stellt dabei einen Schlüsselprozess dar und ist daher ein attraktives Ziel für potentielle Antibiotika. Hochaffine Bindung der Siderophore erfolgt durch Substratbindungsproteine, die Teil von ATP-Bindungskassetten-Transportern sind. Die potentielle Ausnutzung der Transportwege durch Wirkstoffe verlangt eine umfassende funktionelle und strukturelle Charakterisierung der beteiligten Proteine.

In dieser Arbeit wurde ein Affinitätschromatographie-basiertes Verfahren zur Isolierung und Identifizierung eines Substratbindungsproteins aus Zelllysaten durch direkte Wechselwirkung mit seinem natürlichen Liganden entwickelt. Synthetische Derivate des Siderophors Petrobactin wurden auf einer Agarose-Streptavidin-Matrix immobilisiert und mit dem Zelllysate einer *Bacillus subtilis*-Kultur behandelt, was die erfolgreiche Identifizierung des Petrobactin-Bindungsproteins FpiA ermöglichte. Die anschließende biochemische und physiologische Charakterisierung des Proteins bestätigte seine Signifikanz für die Petrobactin-Aufnahme und belegt damit das Potential dieser neuen Methode.

Weiterhin wurde das Triscatecholat-Bindungsprotein FeuA aus *B. subtilis* strukturell und funktionell charakterisiert. Cokristallstrukturen mit den Siderophoren Bacillibactin und Enterobactin sowie dem Siderophor-Mimetikum mecA zeigten einen nahezu identischen Bindungsmodus für die drei verwandten, aber dennoch verschiedenen Eisenkomplexanionen. Eine basische Triade in der Bindungstasche wurde als Hauptbindungsmotiv für die Substrate identifiziert und durch ortsgerichtete Mutagenese und nachfolgende Charakterisierung der Varianten durch Fluoreszenzspektroskopie und ligandenabhängige Schmelzpunktanalyse untersucht. Kristallographische und CD-spektroskopische Experimente zeigten, dass die Bindungstasche nur Δ -stereokonfigurierte Siderophore zulässt, daher wird beispielsweise die Δ -Stereokonfiguration des Eisenkomplexes von Enterobactin bei Bindung durch FeuA invertiert. Auffällig war der nahezu identische Bindungsmodus des Proteins für die verschiedenen Substrate, welcher mit einer Kippbewegung der zwei Domänen von FeuA um etwa 20° einhergeht, der größten bisher experimentell beobachteten Domänenbewegung eines Substratbindungsproteins der Klasse III. Diese Ähnlichkeit des Bindungsmodus impliziert seine Bedeutung für die nachfolgende Erkennung von FeuA durch die kognaten Transmembrandomänen FeuBC des Transporters, die durch Positionierung konservierter Glutamatreste auf der Oberfläche von FeuA ermöglicht wird.

Diese Arbeit zeigt einen neuartigen Ansatz zur Identifizierung bakterieller Substratbindungsproteine und bietet einen detaillierten strukturellen und funktionellen Einblick in die Bindung von Triscatecholatsiderophoren durch solche Proteine.

Summary

To ensure the supply with the essential nutrient and trace element iron, microorganisms have evolved several strategies. The secretion of low molecular weight, chelating molecules, the so called siderophores, takes a very prominent role among the bacterial iron acquisition strategies. The uptake of the iron-loaded siderophores through microorganisms constitutes a key step in this strategy and is therefore an attractive target for potential antibiotic agents. High affinity binding of siderophores is accomplished by substrate binding proteins, which are part of ATP-binding cassette transporters. The potential exploitation of the transport mechanisms through pharmacological agents demands a comprehensive functional and structural characterization of the involved proteins.

In this work an affinity chromatography-based approach for the isolation and identification of substrate binding proteins from crude cell extracts through direct interaction with its natural ligand has been established. Synthetic derivatives of the siderophore petrobactin were immobilized on an agarose–streptavidin matrix and treated with the cell lysate of a *Bacillus subtilis* culture, which allowed the successful identification of the petrobactin binding protein FpiA. The subsequent biochemical and physiological characterization of the protein confirmed its significance for petrobactin import and proved therefore the potential of this new method.

Furthermore, the triscatecholate binding protein FeuA from *B. subtilis* was structurally and functionally characterized. Cocrystal structures with the siderophores bacillibactin and enterobactin and the siderophore mimic mecam showed a nearly identical binding mode for these three related, but nevertheless distinct iron-complexanions. A basic triad within the binding pocket was identified as the main binding motif for the substrates and was examined through site-directed mutagenesis and subsequent characterization of the variants through fluorescence spectroscopy and ligand-dependent melting point analysis. Crystallographic and CD-spectroscopic experiments showed that the binding pocket accepts solely Δ -stereoconfigured substrates, therefore the Δ -stereoconfiguration of the iron-complex of enterobactin is inverted through binding by FeuA. Noticeable was the nearly identical binding mode of the protein for the different substrates, which is attended by a tilting of the two domains of FeuA of about 20°, the greatest experimentally observed domain movement of a class III substrate binding protein so far. This similarity of the binding modes implies its importance for the subsequent recognition of FeuA by the cognate transmembrane domains FeuBC of the transporter, which is facilitated through the correct positioning of conserved glutamate residues on the surface of FeuA.

This work shows a new approach for the identification of bacterial substrate binding proteins and presents detailed structural and functional insights into the binding of triscatecholate siderophore by such proteins.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	VIII
Summary	IX
Inhaltsverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis	XV
Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren	XVIII
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Siderophore</i>	2
1.1.1 Physikochemische Eigenschaften	2
1.1.2 Klassifizierung	3
1.1.3 Biosynthese	5
1.1.3.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen	5
1.1.3.2 NIS-Synthetasen.....	8
1.1.4 Siderophorabhängige Coevolution zwischen Pathogen und Wirt.....	11
1.1.4.1 Siderocalin.....	11
1.1.4.2 „Stealth“-Siderophore	13
1.1.5 Potentielle klinische Anwendungen	14
1.1.5.1 Sideromycine	15
1.1.5.2 Siderophorbasierte Microcine	16
1.1.5.3 Siderophoranaloga.....	17
1.1.5.4 Eisenchelationstherapie.....	19
1.2 <i>Bakterielle Eisenimportsysteme</i>	20
1.2.1 Äußere Membrantransporter.....	21
1.2.2 Der energieübertragende Komplex TonB–ExbB–ExbD	23
1.2.3 ABC-Transporter und Substratbindungsproteine.....	24
1.2.3.1 Substratbindungsproteine	25
1.2.3.2 Transmembrandomänen	29
1.2.3.3 Nukleotidbindungsdomänen	30
1.2.3.4 Funktion und Mechanistik	31

1.3	<i>Eisenhomöostase in Bacillus subtilis</i>	32
1.4	<i>Aufgabenstellung</i>	35
2	Materialien	36
2.1	<i>Geräte</i>	36
2.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	38
2.3	<i>Chemikalien</i>	39
2.4	<i>Enzyme</i>	40
2.5	<i>Oligonukleotidprimer</i>	40
2.6	<i>Vektoren</i>	41
2.6.1	pET-28a(+)	41
2.6.2	pCB-28a(+).....	42
2.7	<i>Mikroorganismen</i>	43
2.7.1	<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168.....	43
2.7.2	<i>Bacillus subtilis</i> ATTC 21332	43
2.7.3	<i>Escherichia coli</i> TOP10	43
2.7.4	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).....	43
2.8	<i>Kulturmedien</i>	44
2.8.1	LB-Medium	44
2.8.2	Belitzky-Minimalmedium ohne Citrat	44
2.8.3	Difco-Sporulationsmedium.....	45
2.8.4	<i>high salt-</i> und <i>low salt-</i> Medium	45
2.9	<i>Puffer und Stammlösungen</i>	46
3	Methoden	49
3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	49
3.1.1	Polymerasekettenreaktion und ortsgerichtete Mutagenese	49
3.1.2	Präparation von genomischer DNA	49
3.1.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	50
3.1.4	Konstruktion der Expressionsplasmide	50
3.1.4.1	Konstruktion von <i>fpiA</i> -pET-28a(+).....	51
3.1.4.2	Konstruktion der <i>feuA</i> -pCB-28a(+)-Varianten.....	51

3.1.5	Herstellung von Deletionsmutanten	51
3.1.6	Wachstumsexperimente	52
3.2	<i>Proteinchemische Methoden</i>	52
3.2.1	Genexpression	52
3.2.2	Zellaufschluss.....	53
3.2.3	Chromatographische Verfahren	53
3.2.3.1	Ni ²⁺ -NTA-Metallionenaffinitätschromatographie	53
3.2.3.2	Gelfiltrationschromatographie	54
3.2.4	Ultrafiltration.....	54
3.3	<i>Analytische Methoden</i>	54
3.3.1	Agarosegelelektrophorese	54
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.3.3	Peptidmassen-Fingerabdruck.....	55
3.3.4	ESI-Massenspektrometrie	55
3.3.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	55
3.4	<i>Spektroskopische Methoden</i>	56
3.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	56
3.4.1.1	Colorimetrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford	56
3.4.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	56
3.4.2	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	57
3.4.3	Fluoreszenzspektroskopie	58
3.4.4	<i>in crystallo</i> -Absorptionsspektroskopie	59
3.5	<i>Proteinkristallisation</i>	59
3.5.1	Automatisiertes Kristallisationsscreening	61
3.5.2	Kristallisationsoptimierung.....	61
3.5.3	Cokristallisation und <i>soaking</i> -Experimente.....	62
3.5.3.1	Cokristallisation.....	62
3.5.3.2	<i>soaking</i> -Experimente	62
3.6	<i>Proteinstrukturbestimmung</i>	63
3.6.1	Testen von Cryobedingungen.....	63
3.6.2	Datensammlung und Datenreduktion.....	63
3.6.3	Strukturlösung und Modellbau durch molekularen Ersatz	63
3.6.4	Strukturverfeinerung.....	64

3.6.5	Bioinformatische Charakterisierung von Sequenzen und Strukturmodellen.....	65
3.7	<i>Isolierung von Bacillibactin.....</i>	67
3.7.1	Ethylacetatextraktion	67
3.7.2	Festphasenextraktion der Kulturüberstände mit XAD-16	68
3.8	<i>Affinitätschromatographische Proteinidentifizierung aus Zellextrakten</i>	68
3.8.1	Probenvorbereitung	68
3.8.2	Affinitätschromatographie	68
3.8.3	Proteinidentifizierung.....	69
4	Ergebnisse.....	70
4.1	<i>Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung des Petrobactin-Bindungsproteins FpiA aus Bacillus subtilis.....</i>	70
4.1.1	Isolierung und Identifizierung – Ergebnisse der Affinitätschromatographie	70
4.1.1.1	Allgemeines Prinzip.....	70
4.1.1.2	Immobilisierung	71
4.1.1.3	Anzucht der Zellen	72
4.1.1.4	Bindung	72
4.1.1.5	Elution	73
4.1.1.6	Tryptischer Verdau und Identifizierung	73
4.1.2	Bioinformatische Charakterisierung.....	75
4.1.3	Bestätigung der physiologischen Relevanz von FpiA.....	76
4.1.4	Charakterisierung von FpiA und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$	77
4.1.4.1	Klonierung, Expression und Reinigung	77
4.1.4.2	Fluoreszenzspektroskopie – Ligandenbindung und -affinität.....	78
4.1.4.3	Circulardichroismus-Spektroskopie – Proteinfaltung und -stabilität, Ligandenkonfiguration	80
4.1.4.4	Massenspektrometrie	83
4.1.5	Kristallisationsansätze	83
4.2	<i>Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Triscatecholat-Bindungsproteins FeuA..</i>	85
4.2.1	Expression, Reinigung und Kristallisation.....	86
4.2.2	Datensammlung, Strukturlösung und -verfeinerung	88
4.2.3	Gesamtproteinstruktur.....	93
4.2.4	Domänenbewegung	96
4.2.5	Bindungstasche.....	97

4.2.6	Bindungsaffinitäten	104
4.2.7	Proteinstabilisierung und thermische Stabilität	106
4.2.8	Charakterisierung der Liganden	109
4.2.8.1	[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	109
4.2.8.2	[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	111
4.2.8.3	[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻	113
4.2.8.4	[Fe ^{III} (VB)] ³⁻ und [Fe ^{III} (2,3-DHB) ₃] ⁶⁻	114
4.2.8.5	Vergleich der Ligandkomplexanionen	115
4.2.8.6	<i>in crystallo</i> -Absorptionsspektroskopie	116
5	Diskussion.....	118
5.1	<i>Petrobactin und sein Bindungsprotein FpiA</i>	118
5.1.1	Vorbemerkungen.....	118
5.1.2	Direkte Identifizierung eines Petrobactin-Bindungsproteins	120
5.1.3	Das Petrobactin-Bindungsprotein FpiA	121
5.1.4	Ausblick.....	124
5.2	<i>Das Triscatecholatsiderophor-Bindungsprotein FeuA und seine Substrate Bacillibactin, Enterobactin und mecam</i>	125
5.2.1	Strukturelle Eigenschaften von FeuA	125
5.2.2	Bindungsmodus von FeuA	132
5.2.3	Charakteristika der gebundenen Siderophore	135
5.2.3.1	Stereokonfiguration und potentielle weitere Substrate	135
5.2.3.2	[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	140
5.2.3.3	[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	141
5.2.3.4	[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻	142
6	Literatur.....	145
	Anhang	162
	Danksagung	172
	Lebenslauf	174

Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> denin
A-Domäne	<u>A</u> denylierungsdomäne
A _x	<u>A</u> bsorption bei einer Wellenlänge von <u>x</u> nm
ABC	ATP-Bindungskassette (engl.: <u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette)
Amp	<u>A</u> mpicillin
APBS	engl.: <u>A</u> daptive <u>P</u> oisson <u>B</u> oltzmann <u>S</u> erver
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
AS	<u>A</u> minosäure(n)
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat
BB	<u>B</u> acillibactin
bidest. H ₂ O	bezeichnet dest. H ₂ O, das durch eine weitere Anlage gereinigt wurde
Biotinyl-PB	Biotinyl-Petrobactin
BLAST	engl.: <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
BOC	<u>B</u> elitsky <u>o</u> hne <u>C</u> itrat
Bp	Basenpaare (engl.: <u>b</u> ase <u>p</u> airs)
2,2'-BPD	<u>2,2'</u> -Bipyridyl
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
c	Konzentration (engl.: <u>c</u> oncentration)
C	<u>C</u> ytosin
CAS	<u>C</u> hromazurol <u>S</u>
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroismus
C-Domäne	Kondensationsdomäne (engl. : <u>c</u> ondensation domain)
C _v	Säulenvolumen (engl.: <u>c</u> olumn <u>v</u> olumes)
Da	<u>D</u> alton
DHB	<u>D</u> ihydroxybenzoat
ddNTP	2',3'- <u>D</u> idesoxynukleosid-5'- <u>t</u> riphosphat
dest. H ₂ O	bezeichnet Wasser, das einen Anionen- und Kationentauscher passiert hat
(-)-3-DHS	(-)-3- <u>D</u> ihydroshikimat
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	2'- <u>D</u> esoxynukleosid-5'- <u>t</u> riphosphat
EB	Elutionspuffer (engl.: <u>e</u> lution <u>b</u> uffer)
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
Ent	<u>E</u> nterobactin
ESI FT ICR MS	engl.: <u>E</u> lectro <u>S</u> pray <u>I</u> onization <u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> on <u>C</u> yclotron <u>R</u> esonance <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry
ESRF	engl.: <u>E</u> uropean <u>S</u> ynchrotron <u>R</u> adiation <u>F</u> acility

Abkürzungsverzeichnis

EtOH	Ethanol
FAD	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
FPLC	engl.: <i>fast performance liquid chromatography</i>
G	<u>G</u> uanin
GB	<u>G</u> riseobactin
HEPES	2-[4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1- <u>p</u> iperaziny]- <u>e</u> thansulfonsäure
IPTG	<u>I</u> sopropyl-1- <u>t</u> hio- β -D-galactopyranosid
Kan	<u>K</u> anamycin
LASER	Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung (engl.: <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i>)
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium (o.a. <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium)
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte LASER-Desorptions/Ionisations-Flugzeit- Massenspektrometrie (engl.: <i>matrix assisted LASER desorption/ionization time of flight mass spectrometry</i>)
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i>
mecam	1,3,5- <i>N,N',N''</i> -Tris(2,3-dihydroxybenzoyl)triaminomethylbenzen
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MFS	engl.: <i>major facilitator superfamily</i>
MM	<u>M</u> inimal <u>m</u> edium
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
MWCO	engl.: <i>molecular weight cut off</i>
NBD	<u>N</u> ukleotid <u>b</u> indungs <u>d</u> omäne(n)
NE	<u>N</u> orepinephrin
NMR	kernmagnetische Resonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NRPS	<u>n</u> icht- <u>r</u> ibosomale <u>P</u> eptid <u>s</u> ynthetase(n)
NTA	Nitrilotriessigsäure (engl.: <i>nitrilotriacetic acid</i>)
OAc	Acetat
OD _x	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte bei einer Wellenlänge von <u>x</u> nm
OMT	äußerer Membrantransporter (engl.: <i>outer membrane transporter</i>)
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> lektrophorese
PB	<u>P</u> etrobactin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCP	engl.: <i>peptidyl carrier protein</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	<u>P</u> roteindaten <u>b</u> ank der <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>
PEG	<u>P</u> oly <u>e</u> thylenglycol
pl	<u>i</u> soelektrischer <u>P</u> unkt
2-PrOH	2-Propanol

rmsd	Wurzel der mittleren quadratische Abweichung (engl.: <u>r</u> oot <u>m</u> ean <u>s</u> quare <u>d</u> eviation)
RNase	<u>R</u> ibo <u>n</u> ukle <u>a</u> se
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
SA	Staphyloferrin A
SAXS	Kleinwinkelstreuung (engl.: <u>s</u> mall <u>a</u> ngle <u>X</u> -ray <u>s</u> cattering)
SB	Staphyloferrin B
SBP	<u>S</u> ubstrat <u>b</u> indungs <u>p</u> rotein(e)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <u>s</u> ize <u>e</u> xclusion <u>c</u> hromatography)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
T	<u>T</u> hymin
TB-Medium	<u>t</u> errific <u>b</u> roth-Medium
TE-Domäne	<u>T</u> hio <u>e</u> sterase <u>d</u> omäne
TEMED	<u>N,N,N',N'</u> - <u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <u>t</u> ri <u>f</u> luoro <u>a</u> cetic acid)
T _M	Schmelztemperatur (engl.: <u>m</u> elting <u>t</u> emperature)
TMD	<u>T</u> rans <u>m</u> embran <u>d</u> omäne(n)
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TVB	<u>T</u> ri <u>v</u> anchro <u>b</u> actin
ÜN	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
ÜNK	<u>Ü</u> bernacht <u>k</u> ultur
ÜT	<u>ü</u> ber <u>T</u> ag
ÜTK	<u>Ü</u> bertag <u>k</u> ultur
UV	<u>U</u> ltraviolett
VIS	sichtbar (engl.: <u>v</u> isible)
v/v	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)

Abkürzungsverzeichnis Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	MW/Da
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Asparaginsäure	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Gln	Q	146
Glutaminsäure	Glu	E	147
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

1 Einleitung

Das chemische Element Eisen stellt eine Grundvoraussetzung für das Wachstum nahezu aller Lebensformen dar. Die bekannteste Ausnahme von dieser Regel sind Lactobacillen, die fähig sind in Milch zu wachsen, welche aufgrund der hohen Konzentration des eisenbindenden Proteins Lactoferrin extrem eisenarm ist.^[1] Eisen wird für zahlreiche physiologische Prozesse benötigt, da es neben der reduzierten Eisen(II)- und der oxidierten Eisen(III)-Form weiterhin einfach miteinander austauschbare Spinzustände annehmen kann und daher einen extrem vielseitigen Cofaktor darstellt. Biologische Anwendungsbeispiele für Eisen-abhängige Cofaktoren beinhalten so physiologisch elementare Prozesse wie die Photosynthese, die Stickstofffixierung oder die Atmungskette, in welchen es in prosthetischen Gruppen wie Häm oder in Elektronenüberträgern wie Eisen-Schwefel-Clustern zum Einsatz kommt. Da es neben seinen Redoxeigenschaften auch das vierthäufigste Element in der Erdkruste ist, wurde es zum idealen Biokatalysator in der Frühzeit des Lebens und bald unverzichtbar. Mit dem Beginn der Photosynthese und der damit verbundenen Veränderung der anoxischen Habitate zu einer oxischen Umgebung wechselte die vorherrschende Form vom relativ leicht löslichen Eisen(II) (0.1 mol L^{-1} bei pH 7.0)^[2] zum extrem unlöslichen Eisen(III) (10^{-9} - $10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$ bei pH 7.0).^[3-4] Daraufhin wurde der essentielle Nährstoff Eisen in vielen ökologischen Nischen durch die vorrangige Bildung von Eisenoxidhydrat- ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) bzw. Eisenhydroxidkomplexen (FeOH_3) rar. Weiterhin kann Eisen unter aeroben Bedingungen extrem toxisch wirken, was auf die eisenkatalysierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS für engl.: *reactive oxygen species*) nach der Fentonreaktion (siehe Gl. (1-1) und Gl. (1-2)) zurückgeht.



Dies machte die Entwicklung von leistungsfähigen Eisenakquisitionssystemen einerseits und eine strikte Regulierung der intrazellulären Eisenhomöostase andererseits unabdingbar. Die Anlage von intrazellulären „Eisenlagern“ sowie die Reduzierung des Eisenverbrauchs unter limitierten Bedingungen sind neben dem hochaffinen Eisenimport aus der Umgebung durch Siderophore die wichtigsten bakteriellen Strategien, um ihren Eisenhaushalt zu regulieren.^[2] Da auch in Mensch und Tier die Konzentration des verfügbaren Eisens äußerst gering ist ($10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ im menschl. Serum), da es durch zahlreiche Proteine wie Lactoferrin oder Transferrin gebunden ist,^[5] gilt dies insbesondere auch für zahlreiche wichtige menschliche und tierische Pathogene für die Eisen daher oftmals einen Virulenzfaktor darstellt.

1.1 Siderophore

Bei Siderophoren (griechisch für „Eisenträger“) handelt es sich um niedermolekulare Verbindungen mit einer Größe von etwa 500-1500 Da, die von zahlreichen Bakterien, Pilzen und teilweise auch höheren Pflanzen sekretiert werden.^[6] Selbst für Säugetiere wurden kürzlich Hinweise auf eigene Siderophore bzw. siderophorartige Verbindungen gefunden.^[7] Sie zeichnen sich durch außergewöhnlich hohe Eisenbindungsaffinitäten aus ($10^{22.5}$ - 10^{49} L mol⁻¹) und können daher Eisen(III) aus der Umgebung bzw. dem Serum mobilisieren.

In der bakteriellen Eisenhomöostase werden Siderophore üblicherweise sekretiert, sobald die intrazelluläre Eisenkonzentration unter den für das mikrobielle Wachstum kritischen Schwellenwert von etwa 10^{-6} mol L⁻¹ fällt.^[8] Deshalb hat die Bioverfügbarkeit von Eisen im jeweiligen Habitat indirekt Einfluss auf die Siderophorproduktion.

Für pathogene Mikroorganismen stellen Siderophore oftmals Virulenzfaktoren dar. Durch ihre Eisenabhängigkeit sind sie auf Siderophore zur Aufrechterhaltung ihres Wachstums und der Ausbildung ihrer Pathogenität angewiesen. Eine Übersicht über Siderophor-assoziierte Infektionen ist in Tab. 1-1 gegeben.

Tabelle 1-1: Infektionen mit den sie verursachenden pathogenen Organismen und den assoziierten Siderophoren (nach [6]).

Infektionstyp	Organismus	Siderophor
Dysenterie	<i>Shigella</i> sp.	Aerobactin
Darminfektionen	<i>Escherichia coli</i>	Enterobactin
Typhus	<i>Salmonella</i> sp.	Salmochelin
Pest	<i>Yersinia</i> sp.	Yersiniabactin
Cholera	<i>Vibrio</i> sp.	Vibriobactin
Lungeninfektionen	<i>Pseudomonas</i> sp.	Pyoverdine
Keuchhusten	<i>Bordetella</i> sp.	Alcaligin
Tuberkulose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mycobactine
Haut- und muköse Membraninfektionen	<i>Staphylococcus</i> sp.	Staphyloferrin A
Anthrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Petrobactin

1.1.1 Physikochemische Eigenschaften

Siderophore besitzen eine hohe Selektivität für Eisen(III) gegenüber Eisen(II), welches weichere Lewisbasen bevorzugt und einen deutlich größeren Ionenradius aufweist. Während es mit Zink(II), Mangan(II), Nickel(II) und Kupfer(II) zahlreiche weitere biologisch wichtige divalente Übergangsmetallkationen gibt, stehen auf der Seite der trivalenten Kationen nur das kinetisch inerte Cobalt(III) und Aluminium(III), das aber einen deutlich geringeren Ionenradius als Eisen(III) besitzt (54 pm gegenüber 65 pm). Daher ist eine eindeutige Spezifität von Siderophoren für Eisen(III) zu finden.^[6] Die hohen Affinitätskonstanten korrelieren mit dem Redoxpotential, welches umso negativer ist je höher die Affinität des Siderophors gegenüber Eisen(III) ist. Die hohe Affinität ist auch

eine Selbstschutzvorrichtung der sekretierenden Organismen, da so die Bildung von Hydroxylradikalen in einer aeroben Umgebung unterdrückt wird.

Als Donoratome für die harte Lewisäure Eisen(III) finden in Siderophoren hauptsächlich negativ geladene Sauerstoffatome Verwendung, allerdings existieren Ausnahmen in denen auch Stickstoff oder Schwefel als Donoratome verwendet werden. Üblicherweise wird eine (annähernd) oktaedrische Koordinationsgeometrie aufgebaut, die die thermodynamisch stabilere high-spin- d^5 -Elektronenkonfiguration begünstigt. Neben der durch Donor–Akzeptor-Wechselwirkungen gewonnenen Enthalpie stellt auch der durch den Chelateffekt besonders starke Entropieterm einen wichtigen Faktor für die thermodynamische Stabilität des Komplexes dar. Daneben ist auch die kinetische Inertheit der Eisen(III)–Siderophor-Komplexe bei neutralen pH-Werten aufgrund der hohen Affinität der sechszähligen Siderophore für Eisen(III) bemerkenswert.^[9] Drei- und zweizählige Siderophore zeigen hingegen größere kinetische Labilität, da einer der Liganden relativ leicht vom Komplex entfernt werden kann.^[10]

Üblicherweise bilden Siderophore 1:1-Komplexe mit Eisen(III), interessanterweise existieren aber auch Komplexe in welchen andere Stöchiometrien vorherrschen und teilweise werden auch mehrkernige Komplexe gebildet. Bekannte Beispiele sind Cepabactin (FeL_3),^[11] Pyochelin (FeL_2 und FeL),^[12] sowie Rhodoturolsäure (Fe_2L_3).^[13]

Zahlreiche Siderophore weisen spezifische stereochemische Eigenschaften auf, da durch die symmetrische, dreizählige Umgebung zweizähliger Liganden Enantiomerenpaare entstehen können. Hierbei spricht man üblicherweise von einem linkshändigen (Λ) bzw. rechtshändigen (Δ) „Propeller“ (Abb. 1-1), die sich durch Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie unterscheiden lassen, da sie genau entgegengesetzt circular polarisiertes Licht absorbieren. Die charakteristischen Spektren gehen auf Ligand→Metall- bzw. auf Ligand→Ligand-charge transfer-Effekte zurück.

Bei asymmetrischen Liganden wie Hydroxamaten kann neben der optischen auch noch geometrische Isomerie auftreten, so dass Λ - bzw. Δ -Konfiguration noch jeweils eine *cis*- und eine *trans*-Form besitzen können.

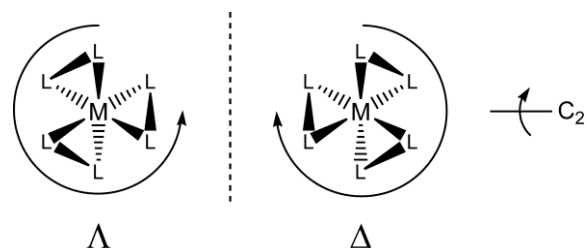


Abbildung 1-1: Λ - bzw. Δ -Konfiguration.

M: Metall, L: Ligand.

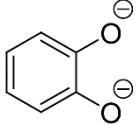
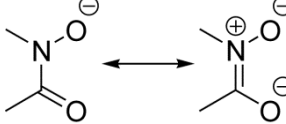
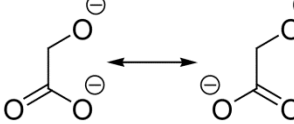
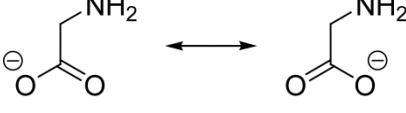
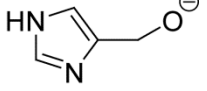
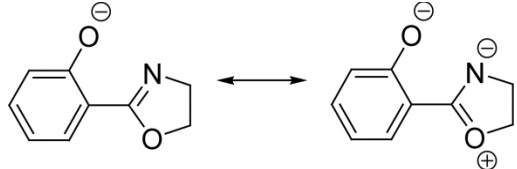
1.1.2 Klassifizierung

Siderophore werden anhand ihrer chemischen Funktionalitäten, die für die Eisen(III)-Koordination verwendet werden, in verschiedene Klassen eingeteilt. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen Catecholat- (inkl. Phenolat-), Hydroxamat- und (α -Hydroxy)-Carboxylatsiderophoren, jedoch gibt es zahlreiche Siderophore, die mehrere Funktionalitäten aufweisen und daher als gemischte Typen klassifiziert werden.

Einleitung

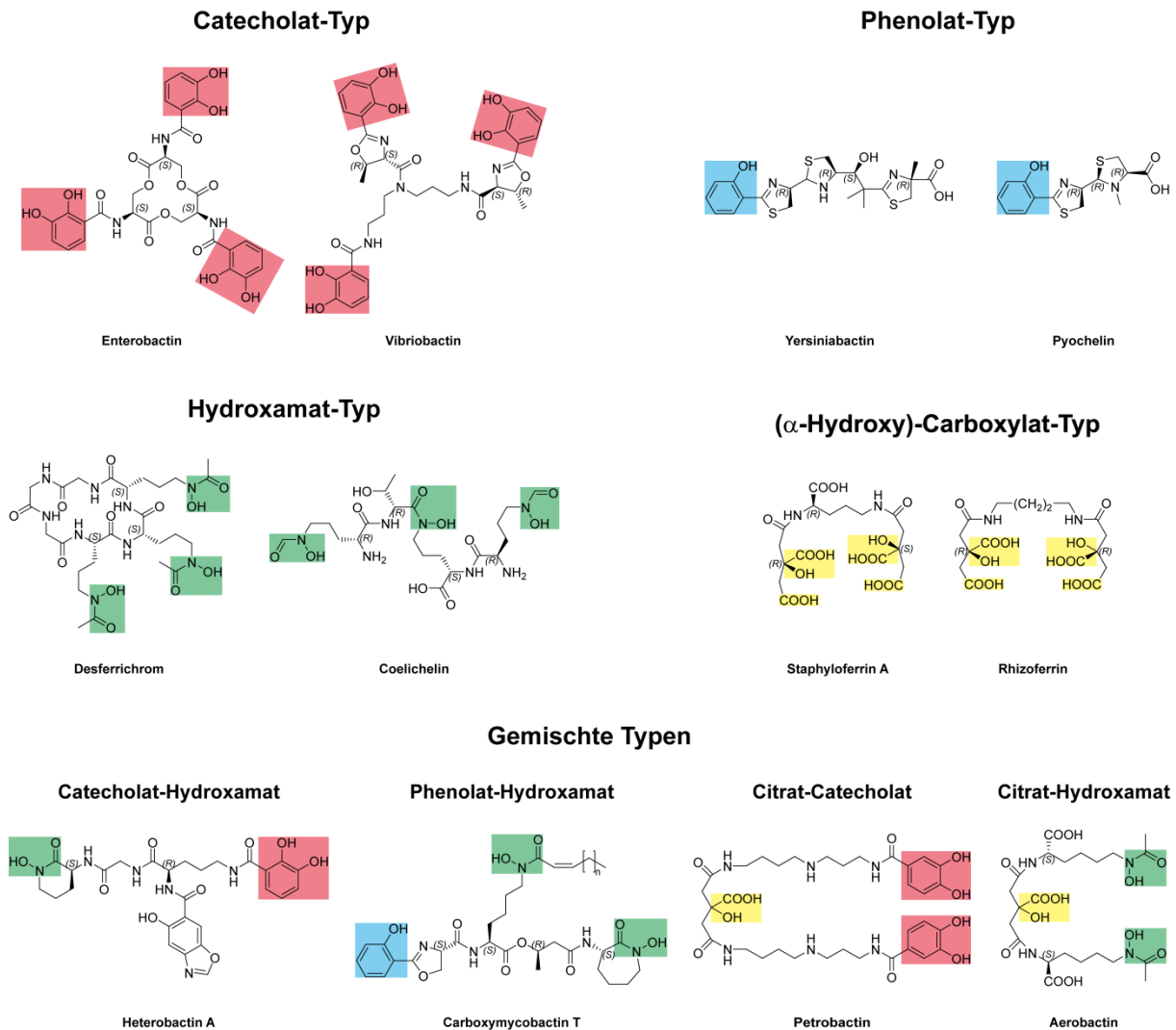
Im Allgemeinen werden mehrere zweizählige Liganden zusammengefügt und bilden ein gemeinsames sechszähliges Molekülion. Ein Überblick über die häufigsten zweizähligen Liganden ist in Tab. 1-2 gezeigt.

Tabelle 1-2: Übersicht über typische Siderophorliganden und ihre pK_a -Werte (nach [6]).

Ligand	pK_a -Werte	Struktur
Catechol	9.2, 13.0	
Hydroxamat	9.0	
α -Hydroxycarboxylat	3.0, 14.5	
α -Aminocarboxylat	2.5, 9.5	
α -Hydroxyimidazol	6.0, 14.5	
Hydroxyphenyloxazon	9.0	

Die Art der sekretierten Siderophore hängt stark vom Habitat des jeweiligen Organismus ab, was sich in den pK_a -Werten der funktionellen Gruppen widerspiegelt. α -Hydroxycarboxylatsiderophore stellen beispielsweise bereits effektive Siderophore bei relativ niedrigen pH-Werten dar, bei welchen Catechol- und Hydroxamatsiderophore noch vollständig protoniert vorliegen. Daher wird diese Siderophorklasse bevorzugt von acidophilen Mikroorganismen sekretiert.^[8,14-15]

Beispiele für reine Catecholatsiderophore sind Enterobactin und Bacillibactin, welche mit $10^{49} \text{ L mol}^{-1}$ und $10^{48} \text{ L mol}^{-1}$ die höchsten bisher bekannten Eisen(III)-Komplexbildungskonstanten aufweisen^[16-17] und welche von (hauptsächlich) Gram-negativen bzw. Gram-positiven Bakterien synthetisiert werden. Als gemischte Vertreter sind beispielsweise Catechol-Hydroxamat-, Phenol-Hydroxamat-, Citrat-Catechol- und Citrat-Hydroxamat-Siderophore bekannt. Ein Überblick über die verschiedenen Klassen mit repräsentativen Vertretern ist in Schema 1-1 gezeigt.



Schema 1-1: Repräsentative Vertreter der verschiedenen Siderophorklassen.

1.1.3 Biosynthese

Die Biosynthese von Siderophoren ist sehr divers und schließt oftmals eine Vielzahl von Enzymen sowohl des Primär- als auch des Sekundärmetabolismus mit ein. Neben der Klassifizierung der Siderophore anhand ihrer chemischen Charakteristika ist auch eine Einteilung aufgrund ihres biosynthetischen Ursprungs möglich: Die erste Klasse ist von sog. nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) abhängig, wohingegen die zweite Klasse NRPS-unabhängig ist (NIS für engl.: NRPS-independent siderophore). Beiden Klassen gemein ist, dass die Gene für die Biosynthesemaschinerien üblicherweise in einem gemeinsamen Gencluster angeordnet sind.

1.1.3.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen

Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen sind in Mikroorganismen weit verbreitet und stellen neben Siderophoren auch zahlreiche andere peptidische Naturstoffe, wie therapeutisch bedeutende Antibiotika oder Immunsuppressiva her. Im Gegensatz zu ribosomalen Peptiden können nicht-ribosomale Peptide deutlich mehr verschiedene Bausteine als nur die 20 proteinogenen

Aminosäuren (AS) enthalten. Neben hydroxylierten, methylierten oder acetylierten AS finden sich auch zahlreiche nicht-kanonische sowie D-AS. Bisher sind etwa 500 verschiedene Bausteine bekannt. NRPS werden in Module eingeteilt, wobei ein Modul jeweils für die Inkorporation eines Bausteins verantwortlich ist. Die einzelnen Module können weiter in Domänen unterteilt werden, von denen die Adenylierungs-(A)-Domäne, das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) und die Kondensations-(C)-Domäne ubiquitär in allen NRPS vertreten sind. Die A-Domäne ist für die Erkennung und Aktivierung des jeweiligen Bausteins als Adenylat verantwortlich und daher direkt ATP-abhängig. Die PCP-Domäne bindet alle Substrate und Intermediate kovalent über ihren 4'-Phosphopantethein-Cofaktor (ppan) und ist sowohl auf Sequenz- als auch auf Strukturebene mit den Acyl-Carrier-Proteinen (ACP) der Fettsäuresynthasen verwandt. Die C-Domäne katalysiert die Peptidbindungsbildung zwischen zwei PCP-gebundenen Intermediaten, dabei korreliert die Zahl der C-Domänen üblicherweise mit der Zahl der gebildeten Peptidbindungen. Eine weitere Domäne, die an der Freisetzung des assemblierten Produkts beteiligt ist, ist die sog. Thioesterase-(TE)-Domäne. Diese ist ausschließlich im terminalen Modul vorhanden und kann lineare, cyclische oder verzweigt-cyclische Peptide abspalten. Daneben existieren zahlreiche weitere optionale Domänen, die für die Epimerisierung, Methylierung, Formylierung oder Cyclisierung der Intermediate verantwortlich zeichnen.^[18-20] Die Produktion NRPS-abhängiger Siderophore soll im Folgenden am Beispiel des Triscatechol-Trimacton-Siderophors Bacillibactin aus *Bacillus subtilis* gezeigt werden.

Bacillibactin wurde erstmals 1997 unter dem Namen Corynebactin aus Kulturen von *Corynebacterium glutamicum* isoliert,^[21] seine Biosynthese jedoch erst im Jahre 2002 in *B. subtilis* beschrieben.^[22] In den nachfolgenden Jahren – nach Sequenzierung des Genoms von *C. glutamicum* – stellte sich heraus, dass dieser Organismus keinerlei Gene für die Biosynthesemaschinerie des Siderophors besitzt und auch nicht in der Lage ist dieses Siderophor aufzunehmen.^[17,23] Die vorherige Isolierung kann daher vermutlich auf eine *Bacillus*-Kontamination zurückgeführt werden, weshalb sich im Folgenden der Name Bacillibactin (BB) durchsetzte.^[24] Bei Bacillibactin handelt es sich um ein Triscatechol-Trimacton-Siderophor, das aus drei Einheiten des Monomers 2,3-Dihydroxybenzoat (2,3-DHB)–Glycin–Threonin assembliert wird. Das Trimacton wird dabei durch die Seitenketten der Threonineinheiten gebildet.

Der BB-Biosynthesegencluster ist in einem einzigen Operon (*dhbACEBF*) organisiert (Abb. 1-2A), das unter Kontrolle des globalen Eisenhomöostasetranskriptionsregulators Fur (engl.: *ferric uptake repressor*) steht.^[25-26] Die Enzyme DhbA, DhbB und DhbC katalysieren die Synthese des Vorläufers 2,3-DHB, während DhbE, DhbB und die NRPS DhbF für die Assemblierung des Siderophors zuständig sind.^[22,27-28]

Die Produktion des BB-Vorläufers 2,3-DHB beginnt ausgehend vom Pentosephosphatweg des Primärmetabolismus, aus welchem (–)-3-Dehydroshikimat ((–)-3-DHS) bezogen wird, welches in mehreren Schritten zu Chorismat umgewandelt wird. Chorismat wird dann von der Isochorismatsynthase DhbC zunächst zu Isochorismat umgesetzt und die Isochorismatlyase DhbB katalysiert anschließend die Hydrolyse der Pyruvatgruppe von Isochorismat, um 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoat zu formen.

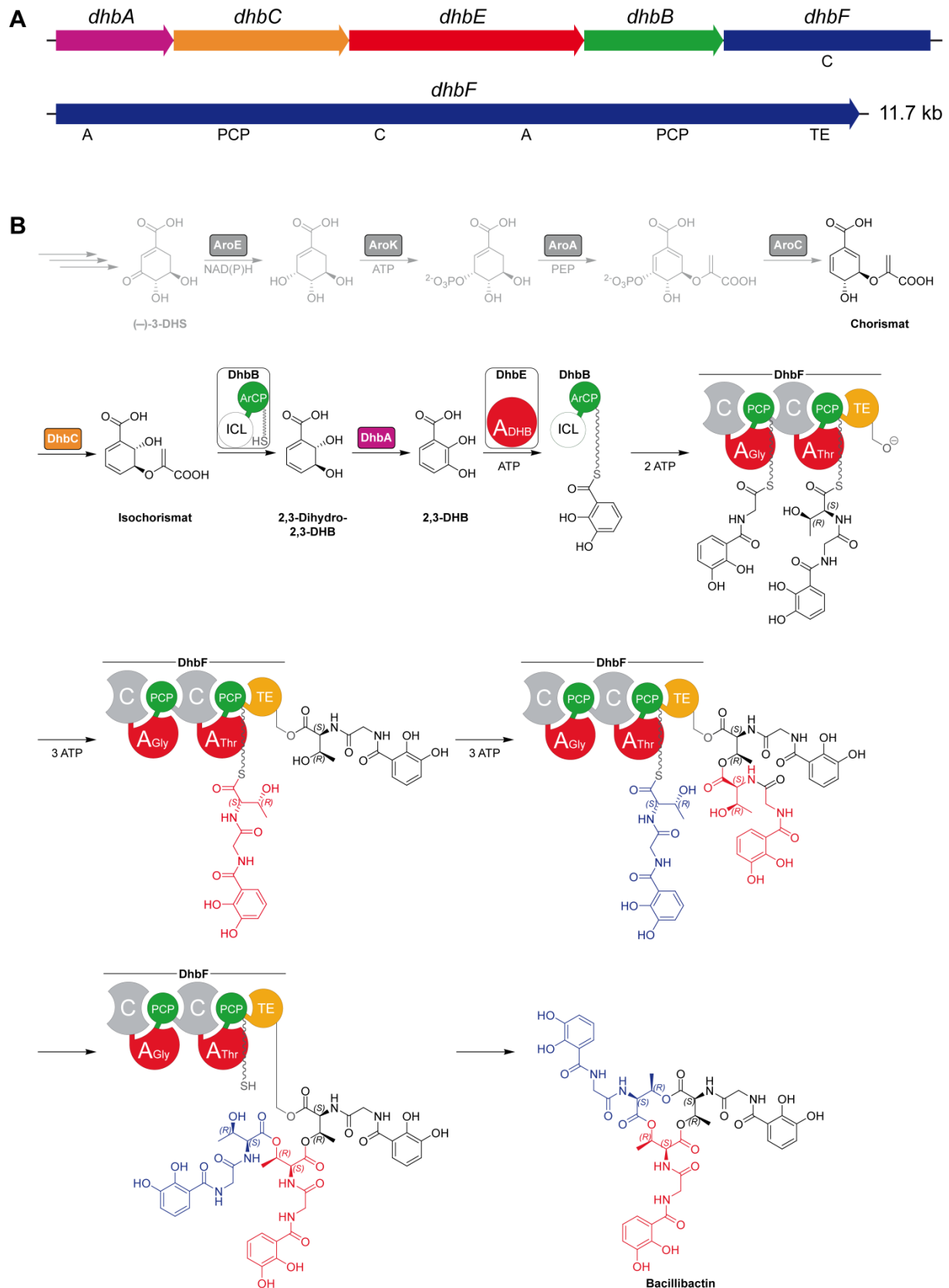


Abbildung 1-2: Gencluster und Biosyntheseschema des Siderophors Bacillibactin in *Bacillus subtilis*.

A) *dhbACEBF*-Operon aus *B. subtilis*. B) Biosyntheseschema. (-)-3-DHS: (-)-3-Dihydroshikimat. 2,3-DHB: 2,3-Dihydroxybenzoesäure. ICL: Isochorismatlyase. ArCP: Aryl-Carrier-Protein. C: Kondensationsdomäne. A: Adenylierungsdomäne. PCP: Peptidyl Carrier Protein. TE: Thioesterasedomäne.

Dieses Zwischenprodukt wird schließlich von der 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoatdehydrogenase DhbA in 2,3-DHB umgewandelt. Die beiden anderen Vorläufer Glycin und Threonin werden direkt aus dem Primärmetabolismus bezogen. Die BB-Synthese beginnt mit der Aktivierung von 2,3-DHB durch die alleinstehende 2,3-DHB-AMP-Ligase DhbE.^[22,29] Neueste Untersuchungen der analogen Enterobactin-Biosynthesemaschinerie aus *Escherichia coli* zeigen, dass diese durch eine Protein-Protein-Interaktion mit der DhbA (EntA in *E. coli*) verstärkt wird.^[30] Anschließend erfolgt die Übertragung des aktivierten Substrats auf DhbB. Dieses ist ein Zweidomänenprotein, das neben der zuvor beschriebenen Isochorismatylaseaktivität auch eine vollständige und aktive Aryl-Carrier-Protein-Domäne trägt,^[22] was auch für die entsprechenden Proteine in den Enterobactin- und Vibriobactin-Biosynthesegenclustern bekannt ist.^[31-33] Anschließend erfolgt die Assemblierung des Peptids durch die NRPS DhbF, wobei zunächst die Peptidbindungsbildung zwischen 2,3-DHB und Glycin und dann zwischen Glycin und Threonin katalysiert wird. Das erste Tripeptid wird dann auf die TE-Domäne geladen, welche anschließend iterativ die Bildung des Trilactons mit den Threonin-Einheiten der weiteren Tripeptide katalysiert und das fertig assemblierte Siderophor anschließend abspaltet (Abb. 1-2B).^[22]

1.1.3.2 NIS-Synthetasen

Neben den NRPS-abhängigen existieren noch die NRPS-unabhängigen Siderophore (NIS). Die NIS-Synthetasen wurden anhand von Sequenzähnlichkeiten als Typ A, B oder C klassifiziert, welche mit verschiedenen Carboxylsäuresubstratspezifitäten korrelieren: NIS-Synthetasen katalysieren Amid- oder Esterbindungsbildung zwischen Amino- oder Hydroxylgruppen einer Vielzahl von Substraten und den zwei prochiralen Carboxylgruppen von Citronensäure (Typ A), den C5-Carboxylgruppen von α -Ketoglutarinsäure (Typ B) bzw. den Carboxylgruppen von Monoamid- oder Monoesterderivaten von Citronen- oder Succinylsäure (Typ C). Eine alternative Einteilung nach den nukleophilen Substraten anstatt der Carboxylsäurespezifitäten erscheint eher unvorteilhaft.^[34] Kürzlich wurde eine phylogenetisch eigenständige Gruppe mit Spezifität für Citronensäure zusätzlich als Typ A' eingeführt.^[35] Eine Gemeinsamkeit zwischen NIS-Synthetasen und NRPS ist die Fähigkeit neben Einzelreaktionen („modular“) auch zwei oder mehr Kondensationen mit demselben Substrattyp katalysieren zu können („iterativ“).^[35]

Ein Beispiel für einen hybriden NRPS-NIS-Biosynthesepfad stellt der für das gemischte Citrat-Catechol-Siderophor Petrobactin (PB) dar. PB wurde 2002 erstmals aus dem marinen Bakterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* isoliert,^[36] wird jedoch auch von nicht-marinen, pathogenen Stämmen wie *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus* produziert.^[37-40] Der Biosynthesegencluster für PB wird im Anthrax-Erreger *B. anthracis* durch das chromosomal lokalisierte *asbABCDEF*-Operon codiert (Abb. 1-3A).^[37,41-43] Obwohl *B. anthracis* (wie auch *B. cereus*) neben PB auch BB produziert, ist nur PB essentiell für das bakterielle Wachstum.^[41] Daher wurde die Biosynthese des Siderophors eingehend untersucht, da sie mögliche Angriffspunkte gegen diese potentielle Biowaffe darstellt. Systemischer Anthrax ist durch eine anfängliche Keim- und Vermehrungsphase geprägt, der dann Bakteriämie – also die Präsenz von Bakterien im Blutkreislauf – und schließlich eine schnell tödliche

Sepsis folgen.^[44] Die Ansteckung kann durch Inhalation oder über Nahrungsaufnahme erfolgen und weist bei Nichtbehandlung eine hohe Mortalitätsrate auf.^[45]

Das Citratrückgrat von PB ist über Spermidinlinker mit zwei 3,4-DHB-Einheiten verbunden, die neben der Citratbasis als Eisen(III)-Liganden fungieren. PB ist neben seinen sulfonierten Analoga^[46-47] bisher das einzige bekannte Catecholatsiderophor mit diesem ungewöhnlichen Hydroxylierungsmuster.^[48]

Die PB-Biosynthese in *B. anthracis* startet mit der Verknüpfung von Citronensäure mit einer Spermidineinheit, welche durch die ATP-abhängige Typ A-NIS-Synthetase AsbA katalysiert wird. Vermutlich wird zunächst die Citronensäure als Acyladenylat aktiviert, um dann nukleophil von der N^8 -Position des Spermidins angegriffen zu werden und so (3'S)- N^8 -Citrylspermidin zu bilden.^[49-50] Die 3,4-DHB-Einheit wird ausgehend von (-)-3-DHS gebildet, welches von der (-)-3-DHS-Dehydratase AsbF direkt in 3,4-DHB umgewandelt wird.^[51-53]

Für die weitere Assemblierung des Moleküls existieren zwei Wege. Zum einen kann (3'S)- N^8 -Citrylspermidin durch AsbB seine zweite Spermidinseitenkette erhalten, um dann durch die Enzyme AsbCDE sequentiell mit den 3,4-DHB-Einheiten verknüpft zu werden. Zum anderen kann (3'S)- N^8 -Citrylspermidin mit 3,4-DHB durch AsbCDE verknüpft werden und anschließend findet eine AsbB-katalysierte Kondensation des entstandenen N^1 -(3,4-Dihydroxybenzoyl)- N^8 -citrylspermidins mit der zweiten Spermidineinheit statt. Im letzten Schritt wird dann die Verknüpfung mit der zweiten 3,4-DHB-Einheit wiederum durch AsbCDE katalysiert. Schlüsselpunkt der Verzweigung ist hierbei die promiske Typ C-NIS-Synthetase AsbB, welche die ATP-abhängige Kondensation von Spermidin sowohl mit (3'S)- N^8 -Citrylspermidin als auch mit N^1 -(3,4-Dihydroxybenzoyl)- N^8 -citrylspermidin katalysieren kann (jeweils bei vorheriger Aktivierung als Acyladenylat).^[54]

Der NRPS-ähnliche Teil des Biosynthesepfads wird durch die Enzyme AsbCDE gebildet: Nach Aktivierung als Adenylat erfolgt die Übertragung auf ein Carrier-Protein und die anschließende Kondensation mit einer Aminogruppe.^[19] AsbC ist die entsprechende 3,4-Dihydroxybenzoesäure-AMP-Ligase, welche zunächst die Adenylierung des von AsbF gebildeten 3,4-DHB und die anschließende Übertragung des aktivierten Substrats auf den ppan-Arm von AsbD katalysiert. Bei AsbD handelt es sich um ein Aryl-Carrier-Protein, das Ähnlichkeiten zu den Acyl- und Peptidyl-Carrier-Proteinen von Polyketidsynthasen und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen aufweist. AsbE kondensiert schließlich das auf AsbD geladene Substrat 3,4-DHB mit den N^1 -Aminogruppen der Spermidinseitenketten der zuvor assemblierten Bausteine (Abb. 1-3B).^[55]

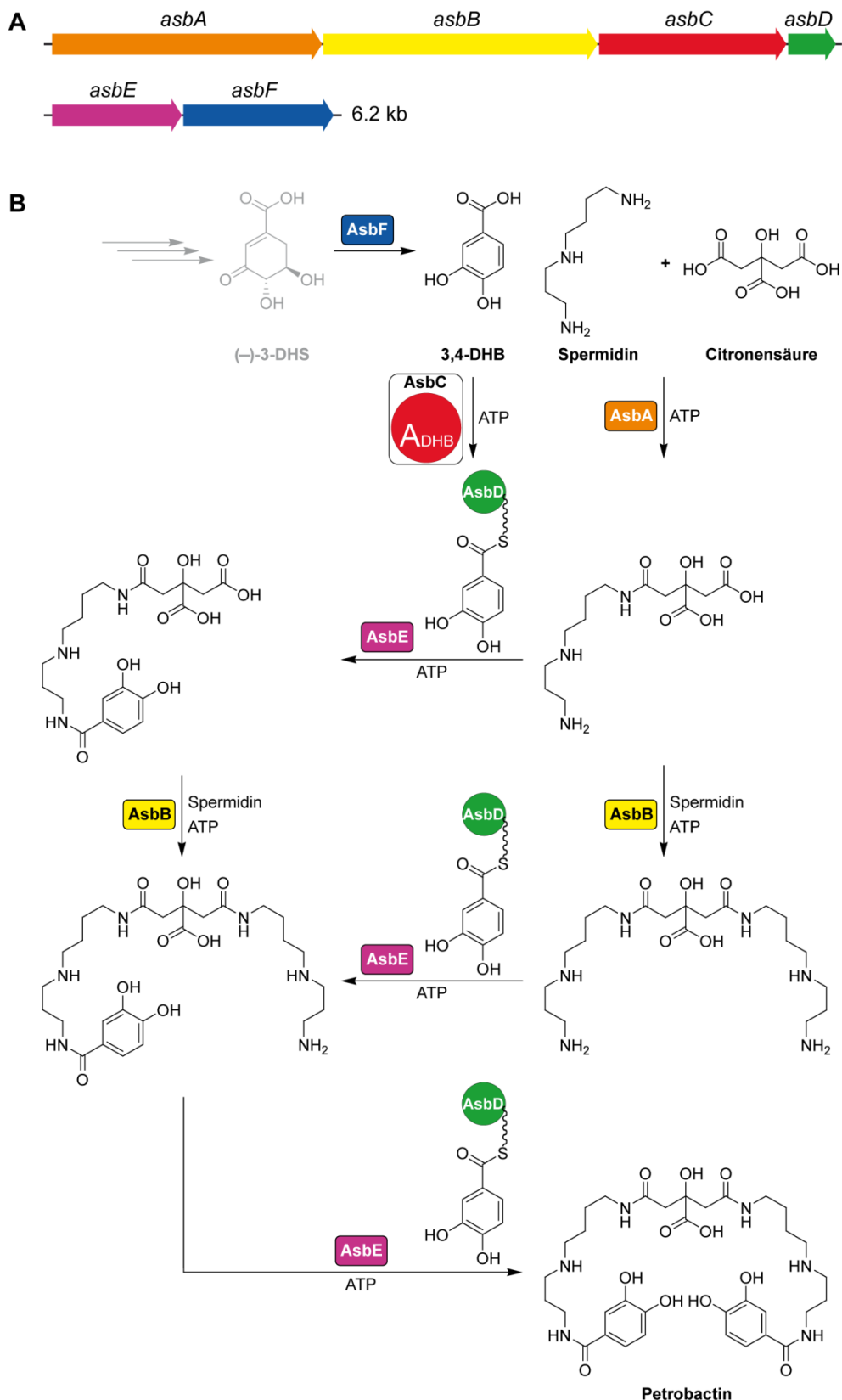


Abbildung 1-3: Gencluster und Biosyntheseschema des Siderophors Petrobactin in *Bacillus anthracis* (nach [40]).

A) *asbABCDEF*-Operon aus *B. anthracis*.

B) Biosyntheseschema. (-)-3-DHS: (-)-3-Dihydroshikimat, 3,4-DHB: 3,4-Dihydroxybenzoesäure.

1.1.4 Siderophorabhängige Coevolution zwischen Pathogen und Wirt

Die Sekretion von Siderophoren ist nicht nur eine Eisenakquirierungsstrategie von marinen oder Bodenbakterien sondern auch von zahlreichen wichtigen Pathogenen. Viele Siderophore sind daher nach ihrem (pathogenen) Produzentenstamm benannt, so beispielsweise Yersiniabactin aus dem Pesterreger *Yersinia pestis*, Vibriobactin aus dem Choleraerreger *Vibrio cholerae* oder die Staphyloferrine aus dem klinisch bedeutsamen Erreger *Staphylococcus aureus*. Obwohl das meiste Eisen im menschlichen Körper in Hämoglobin gebunden ist, liegt noch ein Teil im menschlichen Serum gebunden an Transferrin und intrazellulär gebunden an Ferritine vor. Da Siderophore in aller Regel höhere Eisenbindungsaffinitäten besitzen, vermögen sie es so, die Eisenversorgung des Bakteriums sicherzustellen. Der menschliche Organismus hat sich auf diese Bedrohung eingestellt und reagiert mit der Expression des Proteins Siderocalin aus dem angeborenen Immunsystem, welches Siderophore zu binden vermag. Die Pathogene haben sich dieser Reaktion ihrerseits mit der Sekretion neuartiger oder modifizierter, sog. „Stealth“-Siderophore angepasst.

1.1.4.1 Siderocalin

Siderocalin (auch Lipocalin 2, NGAL (für engl.: *neutrophil gelatinase associated lipocalin*) oder HNL (engl.: *human neutrophil lipocalin*)) ist ein Protein des angeborenen menschlichen Immunsystems. Orthologe aus Ratten (NRL (engl.: *neu-related lipocalin*) oder α_2 -microglobulin related protein) und Mäusen (24p3, SIP24 (für engl.: *superinducible protein 24 kD*) oder Uterocalin) sind ebenfalls bekannt. Die Vielzahl seiner Bezeichnungen drückt bereits die vielfältigen Aufgaben dieses Proteins aus: Siderocalin bzw. seine Orthologen wirken bei so unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Apoptose und Nierenzellendifferenzierung mit. Es wird vermutet, dass diese Prozesse in ligandenabhängiger Weise durch Wechselwirkung mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren durch Siderocalin gesteuert werden. Es wird von Epithelzellen als Antwort auf Entzündungen oder Tumorgenese sekretiert und besitzt die typische, hochkonservierte Lipocalin-Faltung mit der sog. Calyx als Bindungstasche.^[56-57]

Nachdem lange über seine genaue Rolle und die Natur seines Liganden spekuliert wurde, half die Beobachtung, dass das Protein bei heterologer Produktion in *E. coli* eine dunkelrote Färbung annahm, was auf die Coreinigung eines Chromophors hindeutete. Dieses wurde schließlich als Eisen(III)–Enterobactin-Komplex identifiziert, womit erstmals der Ligand von Siderocalin gezeigt werden konnte. Die Affinität von Siderocalin gegenüber diesem Liganden (subnanomolar) ist nochmals um mehrere Größenordnungen höher als die der bakteriellen Transportproteine (mittlerer nanomolarer bis mikromolarer Bereich).^[58] Neben Enterobactin wurden zahlreiche andere Eisen(III)-Komplexe von Catecholatverbindungen als Liganden bestätigt, darunter Bacillibactin,^[59] 2,3-Dihydroxybenzoat und sein Serinkondensat,^[58] Parabactin sowie die synthetischen Analoga mecamin, trenamin und tren-3,2-hopo. Gebunden werden außerdem Carboxymycobactine,^[60] nicht jedoch Hydroxamat- oder Carboxylatsiderophore (Abb. 1-4).^[61]

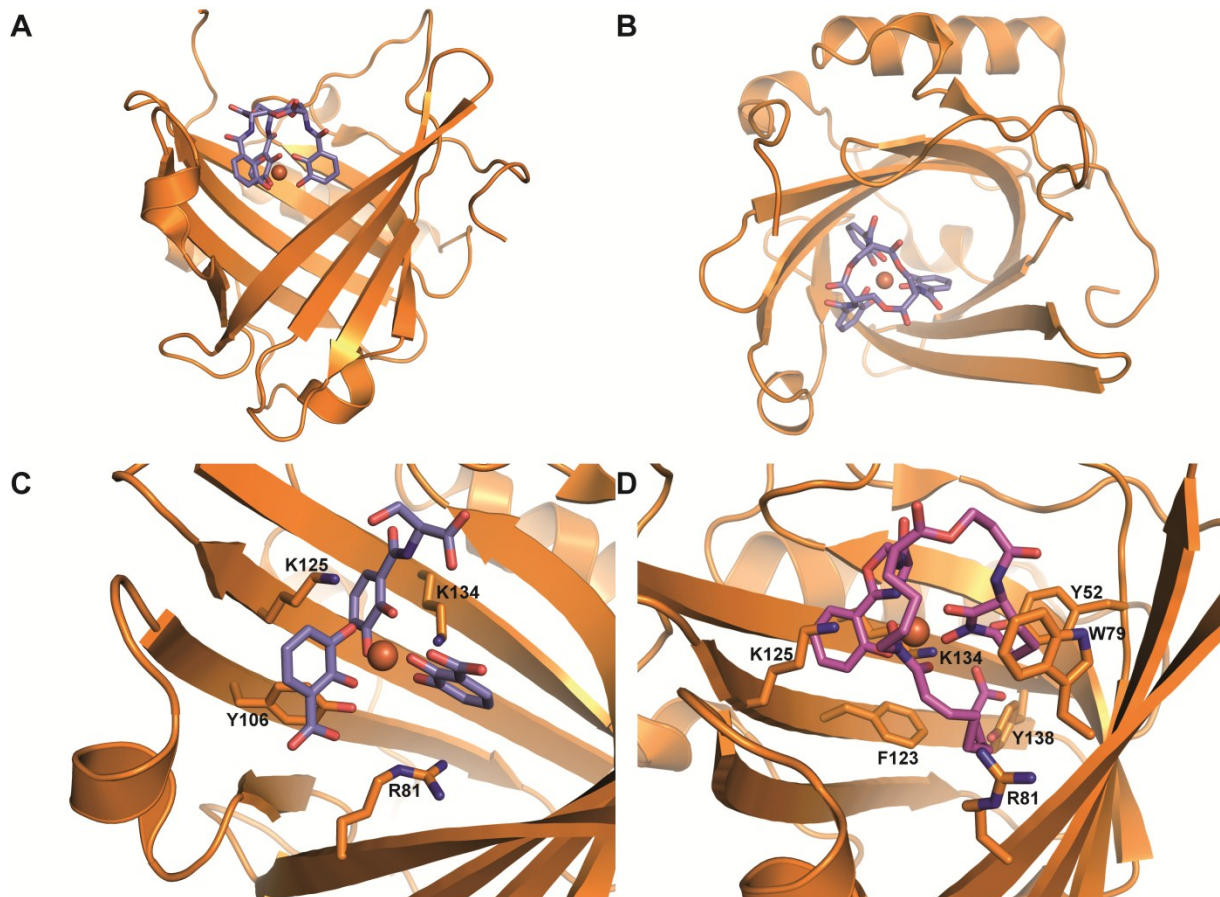


Abbildung 1-4: Kristallstrukturen von humanem Siderocalin.

A) Seitlicher Blick auf Siderocalin- $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ (PDB-Code: 3CMP). B) Blick von oben in die Calyx von Siderocalin- $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ (90° gedreht gegenüber (A)). C) Vergrößerung der Calyx: Gezeigt sind die Enterobactin-Bruchstücke Dihydroxybenzoat und Dihydroxybenzoylserin sowie die sie bindenden Reste (PDB-Code: 1L6M).^[58] D) Vergrößerung der Calyx: Gezeigt ist Carboxymycobactin T und die es koordinierenden Reste (PDB-Code: 1X8U).^[60]

Siderocalin wirkt daher *in vitro* bakteriostatisch,^[58] weiterhin ebenso im Tiermodell: Mäuse, bei denen das entsprechende Gen ausgeschaltet wurde, waren in der Folge deutlich anfälliger gegenüber bakteriellen Infektionen.^[60] Die Bindung der Triscatecholatsiderophore erfolgt hauptsächlich über eine basische Triade, die mit dem Substrat durch hybride elektrostatische/Kation- π -Interaktionen wechselwirkt.^[58,62] Die Triade interkaliert zwischen die drei Catecholateinheiten des Siderophors in cyclisch abwechselnder Art und Weise und kann so neben elektrostatischen auch vorteilhafte Kation- π -Wechselwirkungen aufbauen.^[63] Daneben sorgen zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen für die hohe Affinität des Proteins gegenüber den Liganden.^[58] Weiterhin werden Carboxymycobactin T und S aus *Mycobacterium tuberculosis* bzw. *Mycobacterium smegmatis* durch ein extensives Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kontakten von Siderocalin gebunden.

Die hohen Bindungsaffinitäten erklären sich zum einen in der Konkurrenz mit bakteriellen Transportproteinen und andererseits mit dem Vorteil gegenüber diesen, dass Siderocalin nicht dazu bestimmt ist, das gebundene Substrat wieder abzugeben. Es wird vermutet, dass das Substrat zusammen mit dem Protein über die Nieren ausgeschieden wird. Eine wachsende Zahl von

Untersuchungen deuten jedoch daraufhin, dass Siderocalin auch eine Funktion als Transferrin-unabhängiger Eisenüberträger zwischen Zellen haben könnte, in diesem Fall erfolgt die Freisetzung des Metalls wenn das Protein saure Endosomen durchläuft.^[64-65] In diesem Zusammenhang wird die Verwendung eines kürzlich entdeckten „Säugetier-Siderophors“^[7] oder die Verwendung von Metaboliten wie Catechol diskutiert.^[66] Da sich die Selektivität des humanen Siderocalins auf wenige Siderophore beschränkt und andere wichtige Klassen, wie beispielsweise Hydroxamatsiderophore, nicht gebunden werden, wird vermutet, dass es noch weitere Siderocaline mit anderen Substratspezifitäten gibt. Ein weiteres kürzlich identifiziertes Siderocalin ist das Lipocalin Q83 aus *Coturnix japonica* (Japanwachtel), das ebenfalls Catecholatsiderophore bindet und dessen NMR-Struktur als Komplex mit $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ gelöst wurde.^[67]

Die zuvor beschriebenen Bestrebungen des Einsatzes von Sideromycinen oder Siderophoranaloga als neue Antibiotika müssen aufgrund der Existenz von Siderocalinen überdacht und auf ihre Tauglichkeit hin überprüft werden.^[57]

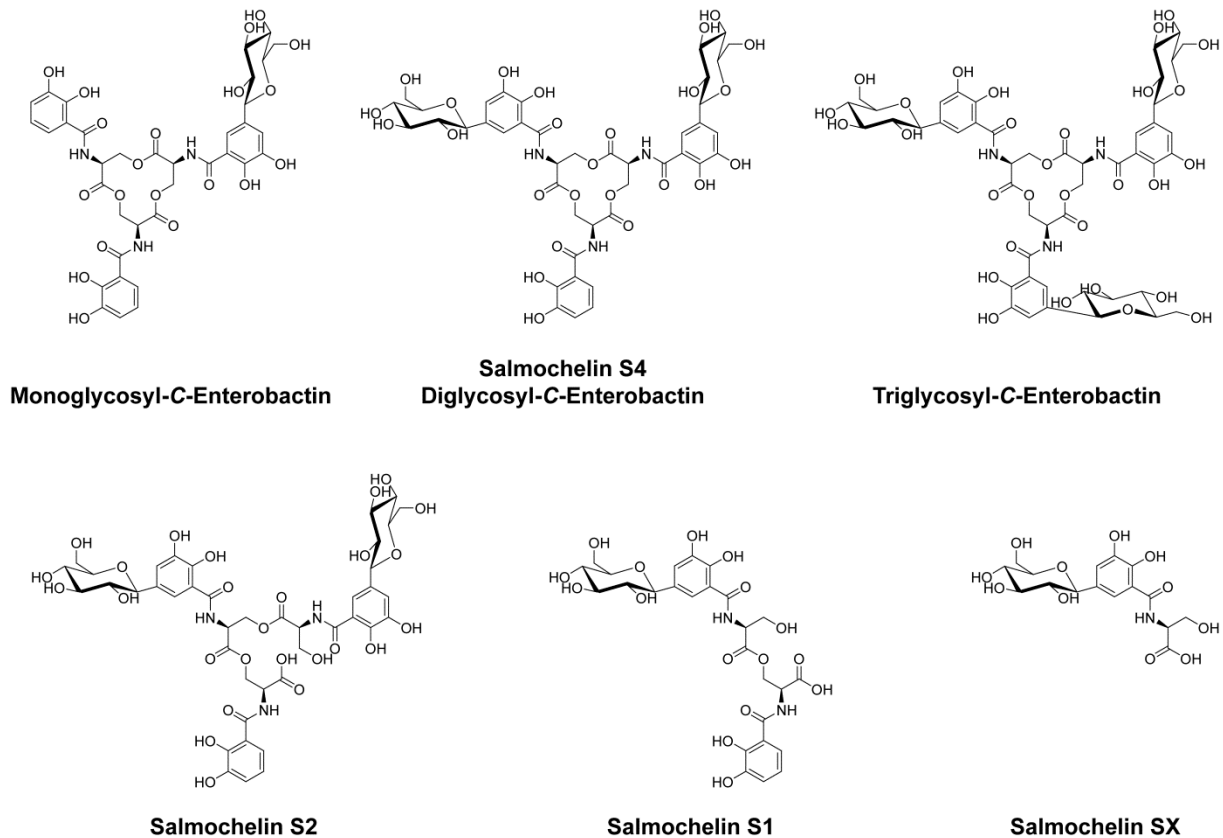
1.1.4.2 „Stealth“-Siderophore

Siderocaline vermögen die Bindung der potentesten Siderophore Gram-negativer (Enterobactin) und Gram-positiver Bakterien (Bacillibactin) sowie von Mycobakterien (Carboxymycobactine), was auch die Existenz mehrerer Siderophorbiosynthesesysteme in einzelnen Bakterien erklärt. So sekretiert *E. coli* neben dem hochaffinen Enterobactin auch das gemischte Citrat-Hydroxamat-Siderophor Aerobactin. Die Bildungskonstanten der Eisenkomplexe von Enterobactin bzw. Aerobactin unterscheiden sich mit $10^{49} \text{ L mol}^{-1}$ und $10^{28} \text{ L mol}^{-1}$ um immerhin 21 Größenordnungen.^[16,68] Die Sekretion von Aerobactin ist für das Bakterium aber dennoch vorteilhaft, da es von Siderocalin nicht erkannt wird.^[61]

Zahlreiche Pathogene haben eine zusätzliche Strategie gegen die „Bedrohung“ durch Siderocalin entwickelt, nämlich die Sekretion neuer oder modifizierter Siderophore. Pathogene *E. coli*- und *Salmonella*-Stämme sekretieren neben Enterobactin noch modifizierte Analoga, sog. Salmocheline.^[69]

Diese verfügen über β -C-glycosylierte 2,3-DHB-Einheiten und teilweise über ein partiell hydrolysiertes Trilactongerüst (Schema 1-2).^[70-71] Es wurde gezeigt, dass diese glycosylierten Siderophore von Siderocalin unter Normalbedingungen nicht erkannt bzw. gebunden werden,^[72-73] allerdings gibt es Hinweise darauf, dass eine Bindung während der Proteinfaltung erfolgen kann.^[74]

Eine alternative Strategie verfolgt der Anthrax-Erreger *Bacillus anthracis*. Er sekretiert neben Bacillibactin das gemischte Citrat-Catechol-Siderophor Petrobactin,^[38] das aufgrund des ungewöhnlichen 3,4-Substitutionsmuster der Catechol-Einheiten von Siderocalin nicht erkannt wird.^[59] Allerdings sollte beachtet werden, dass die Calyx von Siderocalin relativ rigide ist und daher die Bandbreite tolerierter Siderophore einschränkt,^[58,60] so dass möglicherweise die Gesamtform ebenso ausschlaggebend ist wie das Substitutionsmuster der Catecholateinheiten.



Schema 1-2: Salmocheline.

B. anthracis kann seine volle Pathogenität im Mausmodell nur entfalten, wenn Petrobactin produziert wird,^[41] welches daher als Virulenzfaktor gilt. Allerdings wurde gezeigt, dass auch nicht-pathogene *Bacillus*-Stämme die entsprechenden Biosynthesegencluster besitzen und das Siderophor produzieren, so dass seine bloße Anwesenheit nicht indikativ für die Virulenz des entsprechenden Stammes ist.^[39,75] Das ebenfalls produzierte Siderophor Bacillibactin wird in späteren Phasen der Infektion und bei geringeren Temperaturen sekretiert, was auf eine unabhängige Rolle im Lebenszyklus von *B. anthracis* hindeutet.^[76]

1.1.5 Potentielle klinische Anwendungen

Die Abhängigkeit nahezu aller Lebensformen von der Bioverfügbarkeit von Eisen macht Siderophore oftmals zu Virulenzfaktoren pathogener Mikroorganismen, weshalb neben ihrer Biosynthese insbesondere ihr Reimport in die Zelle ein attraktives Ziel für potentielle neue Antibiotika darstellt. Es existiert eine Reihe von Beispielen natürlich vorkommender Siderophorderivate, welche antibakterielle Eigenschaften besitzen. Die prominentesten Vertreter darunter sind die sog. Sideromycine oder auch „Trojanisches-Pferd-Antibiotika“. Weiterhin sind siderophorbasierte Microcine aus einigen Stämmen bekannt, die ebenfalls unter Ausnutzung spezifischer Siderophorimporter in die Zelle gelangen.

Zur Blockierung der Siderophoraufnahme haben nicht-funktionelle Siderophoranaloga in den letzten Jahren verstärkt Interesse auf sich gezogen, da sie auch als kompetitive Eisenchelatoren eingesetzt

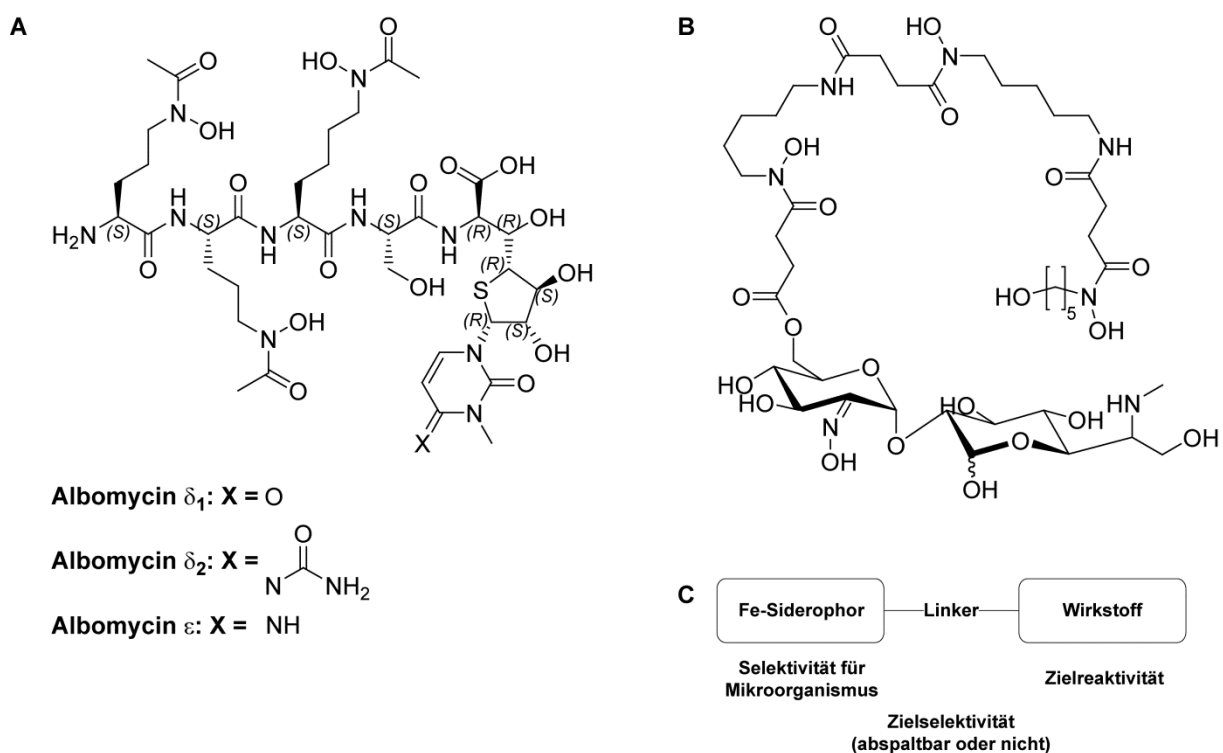
werden können. Weiterhin kann Eisenmangel durch die Verabreichung natürlicher Siderophore in Anwesenheit eines Überschusses eines anderen, metabolisch unwichtigen Metalls induziert werden.^[77]

Klinische Anwendung erfährt bereits das Siderophor Desferrioxamin B, das als Desferal® seit mehr als 40 Jahren erfolgreich in der Chelationstherapie eingesetzt wird, um Eisenüberschuss im Blut entgegenzuwirken.

1.1.5.1 Sideromycine

Sideromycine sind Siderophor-Antibiotika-Konjugate und werden auch als „Trojanisches-Pferd-Antibiotika“ bezeichnet, da sie sich die spezifische Bindung und den bevorzugten Transport von Siderophoren durch äußere Membrantransporter und Bindungsproteine zu Nutze machen. Von großer Bedeutung sind hierbei die Tatsachen, dass es sich um aktiven sowie abhängig vom zugrundeliegenden Siderophor, um Spezies-selektiven Transport handelt.

Natürlich vorkommende Sideromycine sind beispielsweise Albomycine,^[78] Ferrimycine^[79] und Salmycine^[80] (Schema 1-3).



Schema 1-3: Natürlich vorkommende Sideromycine und deren allgemeines Wirkungsschema.

A) Albomycine. B) Salmycine. C) Allgemeines Wirkungsschema von Sideromycinen (nach [81]).

Albomycine mimikrieren den Eisenbindungsmodus von Ferrichrom, Ferrimycin denjenigen von Ferrioxamin B. Sie unterscheiden sich von den natürlichen Siderophoren dadurch, dass sie jeweils eine zusätzliche toxische Gruppe tragen, welche nach dem Import in die bakterielle Zelle enzymatisch abgespalten wird und ihre antibiotische Wirkung entfaltet. Salmycine tragen neben ihrer

Siderophorkomponente eine Aminoglycosidgruppe und sind hocheffektiv gegen Staphylococcen und Streptococcen, auch gegen einige resistente Stämme. Allerdings sind die beschriebenen Beispiele nur als Demonstration des Prinzips tauglich, da einerseits Anzeichen für eine schnelle Resistenzentwicklung bestehen und sie andererseits nicht einfach zugänglich sind.^[77]

Die bisher am Besten untersuchten Sideromycine sind die Albomycine, welche aus einem Tris- δ -*N*-hydroxy- δ -*N*-acetyl-L-ornithinpeptid aufgebaut sind und eine durch einen Serinlinker verbundene nukleosidanaloge Thioribosylpyrimidingruppe als antibiotische Einheit tragen. Die Aufnahme dieser Verbindungen durch Aufnahmesysteme für Hydroxamatsiderophore konnte sowohl durch Mutagenese^[82] als auch durch Cokristallisation des äußeren Membrantransporters FhuA^[83] und des Substratbindungsproteins FhuD^[84] aus *E. coli* mit Albomycin δ_2 gezeigt werden. Die Abspaltung der antibiotischen Gruppe erfolgt durch Peptidase N und ist essentiell für die bakteriozide Wirkung.^[85-86]

Albomycin δ_2 liegt in der Cokristallstruktur mit FhuA aufgrund der Flexibilität des Linkers, welcher die Antibiotikum- und Siderophoreinheiten verbindet, in zwei konformationellen Isomeren vor. In der FhuD-Cokristallstruktur ist die Antibiotikumeinheit solvensexponiert und nimmt offenbar eine Vielzahl von Konformationen ein, weshalb keine definierte Elektronendichte sichtbar war.^[84] Die Bindung des Sideromycins beschränkt sich in beiden Proteinkomplexen im Wesentlichen auf die funktionelle Einheit des Siderophors, also auf die eisenbindenden Liganden (in FhuD finden überhaupt keine Interaktionen mit der antibiotisch wirksamen Gruppe statt). Dies erklärt die Substratpromiskuität der Transporter, deren Erkennung sich im Wesentlichen auf die chemischen Charakteristika der Siderophorklasse stützt und daher die zusätzliche antibiotische Gruppe toleriert.^[83-84]

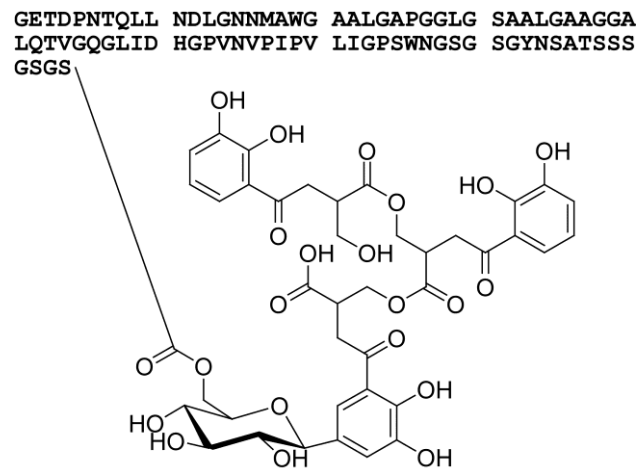
Prinzipiell kann daher jede beliebige antibiotische Einheit mit jedem beliebigen Siderophorgerüst verknüpft werden, sei es über semi- oder totalsynthetische Methoden. Die ersten systematischen Arbeiten dazu wurden in den 1990er Jahren durchgeführt.^[87-90] Bedingt durch den aktiven Transport bietet sich die „Trojanisches-Pferd-Strategie“ insbesondere für solche Antibiotika an, die nur schlecht oder gar nicht membrangängig sind, da der aktive Transport die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) um mehr als das 100-fache reduziert.^[91-92] Ein Hauptproblem dieser Strategie sind jedoch die oftmals unzureichenden Informationen über Eisenaufnahmesysteme des betreffenden Pathogens. Je mehr Aufnahmesysteme vorhanden sind, desto schwieriger ist die Wahl eines geeigneten Sideromycins.^[6] Die (insbesondere strukturelle) Charakterisierung bakterieller Eisenaufnahmesysteme ist daher für die Entwicklung und den erfolgreichen Einsatz neuartiger, synthetischer Sideromycine von großem Interesse.^[86]

1.1.5.2 Siderophorbasierte Microcine

In den letzten Jahren rückten verstärkt antibakteriell wirkende, siderophorgekoppelte Microcine (Mcc) in den Blickpunkt des Interesses. Microcine gehören zu den Bacteriocinen, also proteinogenen Toxinen, welche das Wachstum anderer Bakterienstämme inhibieren. Sie sind entweder chromosomal oder Plasmid-codiert und werden ribosomal synthetisiert. Einige Microcine wurden als

siderophorbasiert beschrieben, d.h. dass eine Siderophoreinheit mit der Polypeptidkette verknüpft ist.^[8] Beispiele umfassen die Microcine MccH47, MccI47 und MccM aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen und MccE492 aus *Klebsiella pneumoniae* RYC492. Die Biosynthese von MccE492 und MccH47 ist jeweils abhängig von der Enterobactinproduktion, weiterhin ist der Gencluster für die Salmochelinbiosynthese notwendig.^[93-94] Der Peptidanteil von MccE492m ist mit seiner C-terminalen Carboxygruppe über eine O-glycosidische Bindung mit der β -D-Glucoseeinheit von monoglycosyliertem, im Trilacton hydrolysiertem Enterobactin verknüpft (Schema 1-4).^[93,95] Für MccH47 und MccM wurde kürzlich eine analoge posttranslationale Modifikation nachgewiesen^[96] und für MccI47 wird eine solche Modifikation ebenfalls vermutet.^[97] Weiterhin wurde kürzlich die Existenz von MccG492 als fünftes siderophorbasiertes Microcin vorgeschlagen.^[96]

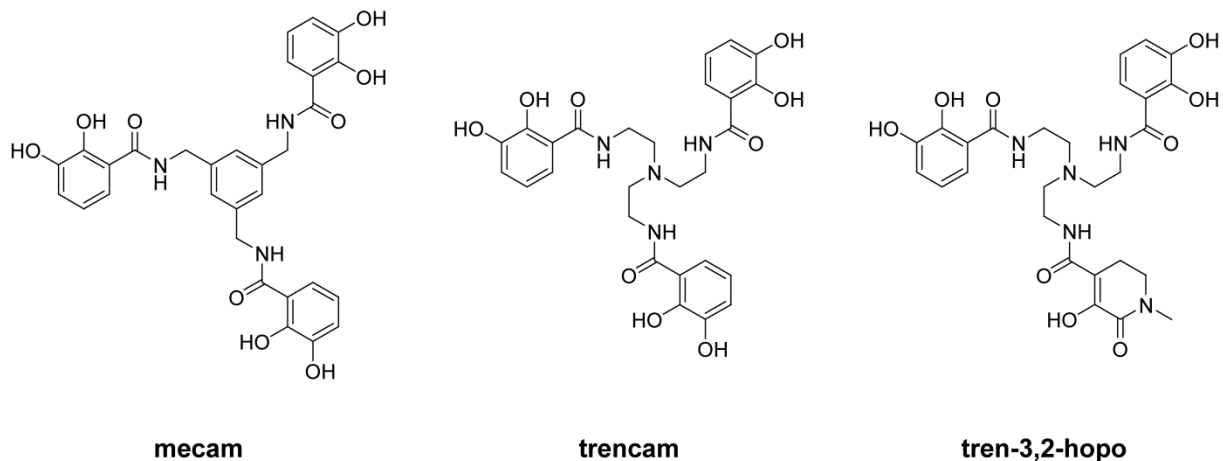
Das posttranslational modifizierte Microcin MccE492m und sein unmodifiziertes Derivat MccE492 zeigen beide ein auf einige Gram-negative *Enterobacteriaceae*-Spezies beschränktes, enges Aktivitätsspektrum.^[93,98] Zunächst erfolgt die Aufnahme ins Periplasma durch Catecholatsiderophortransporter und anschließend findet eine Depolarisierung der Cytoplasmamembran durch ihre Permeabilisierung vermutlich unter Ausbildung einer Pore statt.^[95] Die antibakterielle Wirkung des modifizierten MccE492m ist dabei zwei- bis achtfach stärker, was die Bedeutung des aktiven Transports durch die Siderophortransporter nahelegt, auch wenn gezeigt wurde, dass auch das unmodifizierte MccE492 durch diese Transporter aufgenommen wird.^[93,95,98]



Schema 1-4: Microcin E492m.

1.1.5.3 Siderophoranaloga

Eine weitere potentielle Strategie zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen unter Ausnutzung der Eisenaufnahmesysteme stellen Siderophoranaloga dar. Es handelt sich dabei um synthetisch hergestellte Verbindungen, die den Eisenbindungsmodus natürlicher Siderophore mimikrieren. Die eisenbindenden Liganden selbst beinhalten dabei die üblichen, charakteristischen Siderophorgruppen, was für eine Ausnutzung nativer Transportwege von essentieller Bedeutung ist. Siderophoranaloga wurden weiterhin intensiv verwendet um ihre Eisenbindungseigenschaften, strukturelle, funktionelle, Redox- und viele weitere Charakteristika zu bestimmen und mit nativen Siderophoren zu vergleichen. Insbesondere Triscatecholatsiderophor-Analoga wurden als nicht-hydrolysierbare Mimikri des wichtigen Siderophors Enterobactin untersucht. Einige dieser Siderophoranaloga sind in Schema 1-5 gezeigt.



Schema 1-5: Triscatecholatsiderophor-Analoga.

Der bakteriostatische Effekt wird durch Erzeugung von eisenlimitierenden Bedingungen erreicht, indem die Aufnahme nativer Siderophore blockiert bzw. herabgesetzt wird. Dies kann durch kompetitive Eisenchelation oder durch Blockierung der Aufnahmesysteme erreicht werden, jeweils unter Verwendung eines Überschusses an Siderophoranalogon.^[77]

Eine neuartige Strategie wurde durch die Cokristallstruktur des Substratbindungsproteins CeuE aus *Campylobacter jejuni* mit dem synthetischen Triscatechol 1,3,5-Tris(*N,N',N''*-2,3-dihydroxybenzoyl)aminomethylbenzen (mecamin) inspiriert: Die Struktur zeigt eine ligandenabhängige Dimerisierung der Proteine (Abb. 1-5A).^[99]

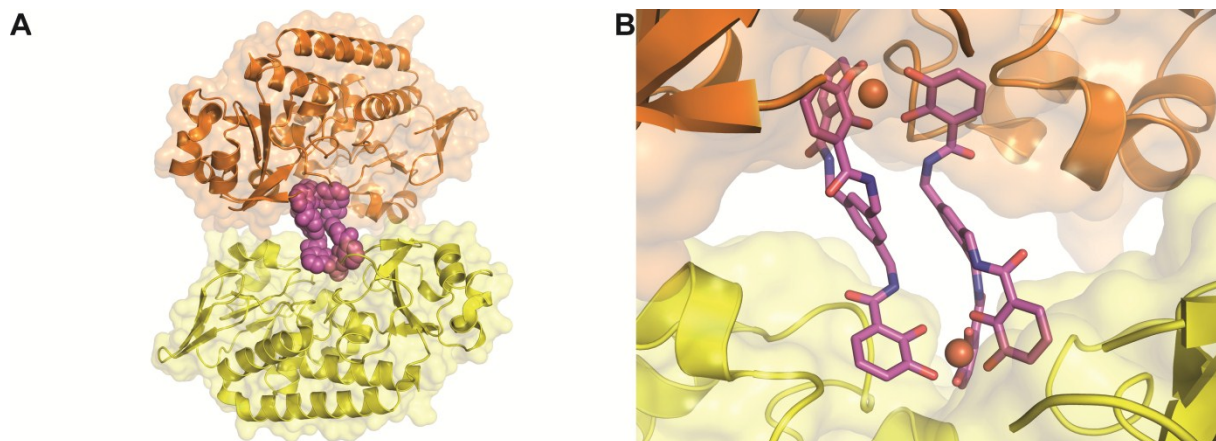


Abbildung 1-5: Kristallstruktur des $\text{CeuE}_2 \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecamin})]_2^{6-}$ -Dimers.

A) Das Proteindimer ist als gelbes bzw. oranges Bändermodell dargestellt, das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecamin})]_2^{6-}$ -Dimer als raumfüllende Darstellung in violett (PDB-Code: 2CHU).^[99] B) Zoom auf das zweikernige $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecamin})]_2^{6-}$ -Komplexanion, das als Stabmodell dargestellt ist (C: violett, O: rot, N: grün, Fe: orange Kugel).

Je zwei Catecholateinheiten des einen mecamin-Anions binden zusammen mit je einer weiteren Catecholateinheit des zweiten mecamin-Anions je ein Eisen(III)-Ion. Dabei ergibt sich eine langgezogene Struktur beider mecamin-Einheiten (Abb. 1-5B), die durch π - π -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Rückgrat der beiden Siderophoranaloga stabilisiert wird. Diese kristallographisch beobachtete Struktur widerspricht Berechnungen, welche eine einkernige Struktur

des Siderophoranalogs voraussagten.^[100] Allerdings ist die Annahme der zweikernigen Struktur auch in Lösung denkbar und da keine weiteren mecA-verbrückten Proteine bekannt sind, bleibt unklar ob es sich um ein Kristallisationsartefakt oder ein physiologisch relevantes Phänomen handelt. Physiologische Untersuchungen der mecA-vermittelten Eisenaufnahme wurden schon früh in *E. coli* durchgeführt, allerdings sind die veröffentlichten Daten teilweise widersprüchlich: Während erste Wachstumsexperimente eine fast mit Enterobactin vergleichbare Wachstumsförderung darlegten,^[101-102] zeigten spätere Untersuchungen eine Akkumulation des Eisen(III)–mecA-Komplexes im Periplasma.^[103-104] Allerdings ist unklar, ob dies auf eine mecA-abhängige Dimerisierung des kognaten Substratbindungsproteins FepB zurückzuführen ist.

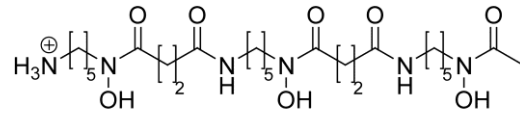
Nichtsdestoweniger stellt die Dimerisierung von Substratbindungsproteinen durch zweikernige Siderophoranaloga im Periplasma eine vielversprechende Strategie zur Inhibition der Eisenaufnahme dar. Da Substratbindungsproteine auch die unbeladene Form der nativen Siderophore erkennen, ist dies möglicher- und wünschenswerterweise auch unter Ausschluss vorheriger Eisenbeladung möglich. Vorteile dieses Ansatzes liegen in der Ausnutzung der hohen Affinitäten der Substratbindungsproteine für ihre jeweilige Siderophorklasse und in der Tatsache, dass nur eine Durchquerung der äußeren Membran erreicht werden muss.^[8]

1.1.5.4 Eisenchelationstherapie

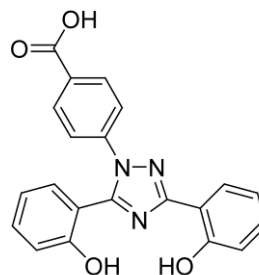
Eine klinische Anwendung die Siderophore bereits seit mehr als 40 Jahren erfahren haben, ist die sog. Eisenchelationstherapie. Dabei macht man sich die außerordentliche Affinität von Siderophoren gegenüber Eisen zu Nutze, indem man sie Patienten mit akuter Eisenvergiftung verabreicht. Insbesondere erhöhten Eisenkonzentrationen im Serum kann mit Hilfe der Chelationstherapie begegnet werden. Diese treten oftmals auch in Verbindung mit Bluttransfusionen auf, die beispielsweise eingesetzt werden, um Patienten mit chronischen Anämien zu behandeln. Für Patienten mit β -Thalassämie sind diese Behandlungen lebenswichtig, allerdings enthält jede erhaltene Bluttransfusionseinheit 200-250 mg Eisen, die der Körper nicht aktiv ausscheiden kann.^[105-106] Das am häufigsten verwendete Siderophor für die Eisenchelationstherapie ist Desferrioxamin B aus *Streptomyces pilosus* (Schema 1-6), auch bekannt unter seinem Handelsnamen Desferal®, das seit mehr als 40 Jahren klinisch genutzt wird. Die Behandlung ist jedoch anspruchsvoll und mit Komplikationen behaftet. So entsteht durch die Verwendung eines bakteriellen Siderophors ein erhöhtes Infektionsrisiko mit *Yersinia*- oder *Klebsiella*-Stämmen, welche Desferrioxamin B zur eigenen Eisenaufnahme nutzen können.^[105]

Idealerweise sollte ein therapeutischer Eisenchelator oral verabreichbar, nicht von Pathogenen als Eisenquelle genutzt werden können, nicht toxisch und sowohl in Wasser als auch in Lipiden löslich sein um eine einfache Gewebegänglichkeit sicherzustellen. Zur Zeit werden neben Desferrioxamin B zwei weitere Eisenchelatoren klinisch angewendet, nämlich Deferipron (Ferriprox®) und Deferasirox (Exjade®), die aus zwei- bzw. dreizähligen Liganden bestehen (Schema 1-6).

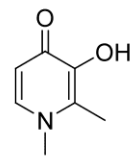
Deferipron (1,2-Dimethyl-3-hydroxypyrid-4-on) ist in der Europäischen Union und zahlreichen anderen Staaten (jedoch nicht in den USA und Kanada) für die klinische Behandlung von β -Thalassämie zugelassen, beispielsweise wenn die Gabe von Desferrioxamin B kontraindiziert oder nicht adequat ist. Nichtsdestoweniger wird es häufig auch in einer Kombinationstherapie mit diesem eingesetzt. Deferasirox ist ein äußerst lipophiles *N*-substituiertes *bis*-Hydroxyphenyltriazol, das gegenwärtig u.a. in den USA und der EU klinisch zugelassen ist. Besonders vorteilhaft ist, dass es bedingt durch seine Halbwertszeit durch eine einmalige tägliche Gabe für 24 h im therapeutisch wirksamen Konzentrationsbereich bleibt. Über die bereits zugelassenen Stoffe Deferipron und Deferasirox hinaus sind nur einige wenige Eisenchelatoren in klinischen Versuchsstadien, von denen nur zwei weitere nach oraler Verabreichung aktiv sind.^[106]



Desferrioxamin B (Desferal®)



Deferasirox (Exjade®)



Deferipron (Ferriprox®)

Schema 1-6: Klinisch verwendete Eisenchelatoren.

1.2 Bakterielle Eisenimportsysteme

Der Transport von Nährstoffen, Spurenelementen oder Wachstumsfaktoren durch Membranen und damit gegen den Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulärem Raum ist einer der fundamentalsten Prozesse des Lebens. Der Reimport eisenbeladener Siderophore stellt daher neben der vorherigen Sekretion der Siderophore durch ihre Produzenten einen Schlüsselschritt der bakteriellen Eisenhomöostase dar.

Bei der Beschreibung bakterieller Systeme für die hochaffine Eisenaufnahme muss zwischen Gram-negativen und Gram-positiven Organismen unterschieden werden. Die äußere Membran Gram-negativer Organismen stellt eine zusätzliche Barriere dar und hat die Entwicklung weiterer hochaffiner Importsysteme notwendig gemacht. Während Siderophore in Gram-positiven Organismen nur die Cytoplasmamembran überwinden müssen und zu diesem Zweck auf ATP-Bindungskassettentransporter (ABC-Transporter) zurückgreifen, bestehen Siderophorimportsysteme Gram-negativer Bakterien aus drei Teilen: Einem hochaffinen und hochselektiven äußeren Membrantransporter, dem energieübertragenden Proteinkomplex TonB–ExbB–ExbD sowie eines ABC-Transporters. Die einzelnen Komponenten sollen im Folgenden detailliert beschrieben werden.

1.2.1 Äußere Membrantransporter

Da sie den Größenausschluss von Porinen übersteigen, nutzen Siderophore hochspezialisierte Transporter zur Überwindung der äußeren Membran als erste zelluläre Barriere und zur Aufnahme in den periplasmatischen Raum. Diese Transporter sind in der Regel hochselektiv, da sie meist nur ein einziges Substrat akzeptieren, was eine hohe Zahl an verschiedenen Transportern notwendig macht. Obwohl die Sequenzidentitäten mit etwa 20% eher gering sind, weisen alle eine gleichartige dreidimensionale Faltung auf: Zur Einbettung in die Membran wird ein 22-strängiges antiparalleles β -Fass gebildet und der Verschluss der entstandenen Pore wird durch die *N*-terminale, sog. „Korken“-Domäne erreicht (Abb. 1-6A und B).

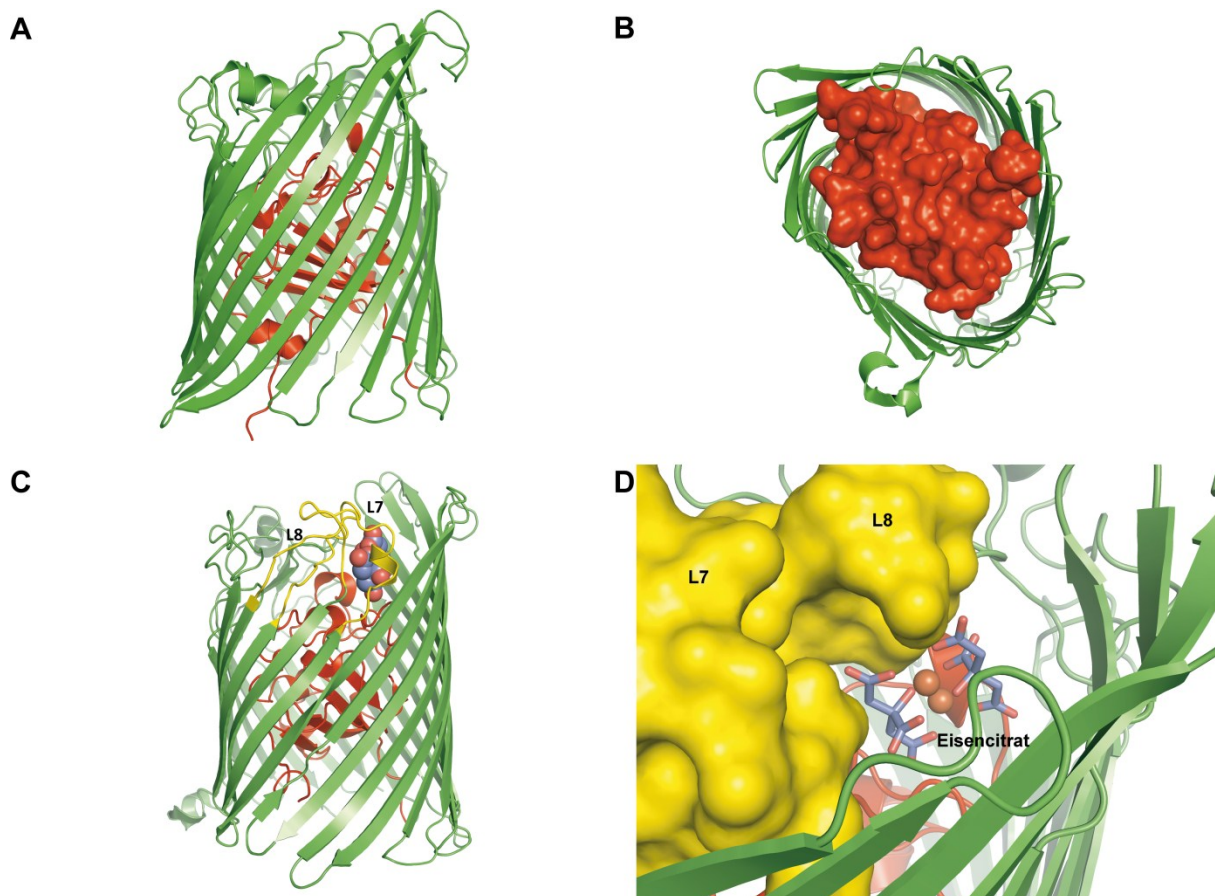


Abbildung 1-6: Kristallstruktur des äußeren Membrantransporters FecA.

A) Seitlicher Blick auf den äußeren Membrantransporter FecA aus *E. coli* (PDB-Code: 1KMO).^[107] Das β -Fass ist grün und die „Korken“-Domäne ist rot dargestellt. B) Blick durch das β -Fass vom extrazellulären Raum aus. C) Eisencitrat ist in raumfüllender Darstellung gezeigt (C: hellblau, O: rot, Fe: orange), die für die Substratbindung verantwortlichen Loops L7 und L8 gelb (PDB-Code: 1KMP).^[107] D) Zoom in die FecA-Bindungstasche. Die Loops L7 und L8 sind in Oberflächendarstellung gezeigt und das Substrat Eisencitrat als Stabmodell.

Die 22 β -Stränge sind durch 10 kurze Turns im Periplasma und durch 11 längere Loops im extrazellulären Raum miteinander verbunden und das β -Fass wird durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen und über eine Salzbrücke zwischen den Strängen 1 und 22 stabilisiert. Es wird angenommen, dass die extrazellulären Loops, die eine Länge von bis zu 37 AS-Resten haben

und sich um bis zu 40 Å oberhalb der äußeren Membran erstrecken können, für die ersten Interaktionen mit dem Substrat verantwortlich sind und dass sie die Pore gegenüber nicht erwünschten Substraten verschließen.^[108] Für den Eisencitrattransporter FecA wurde beispielsweise gezeigt, dass nach der Deletion der Loops 7 und 8 keine Bindung und kein Translokation des Substrats durch den Transporter mehr erfolgen (Abb. 1-6C).^[109] Weiterhin erfolgt nach Bindung des Substrats eine signifikante konformationelle Änderung dieser beiden Loops, die die Solvenszugänglichkeit des Eisencitrats merklich reduziert (Abb. 1-6D).^[107]

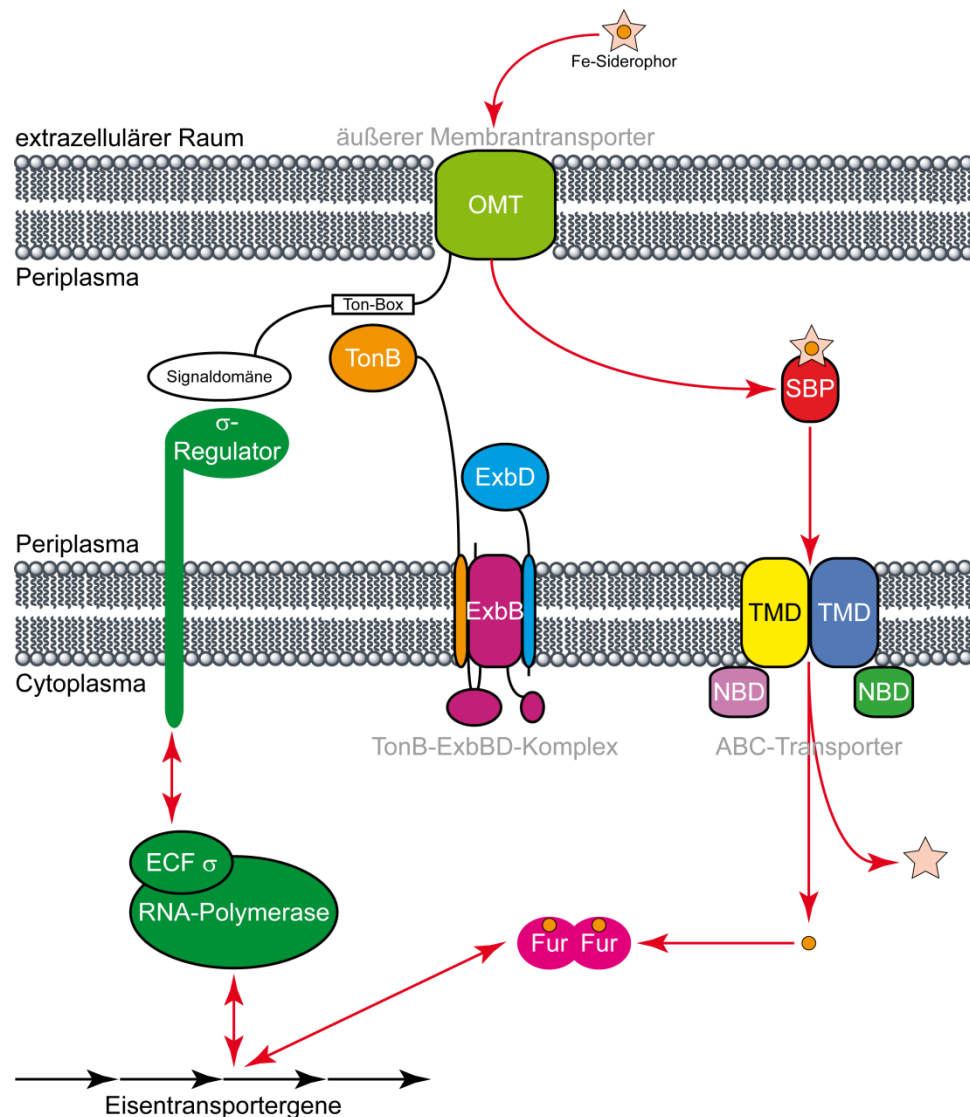


Abbildung 1-7: Schema der Eisen-Siderophor-Aufnahme und ihrer Regulation in Gram-negativen Bakterien (nach [110] und [111]).

OMT: Äußerer Membrantransporter (engl.: *outer membrane transporter*). SBP: Substratbindungsprotein. TMD: Transmembrandomäne. NBD: Nukleotidbindungsdomäne. ECF: engl.: *extracytoplasmic function*.

Die „Korken“-Domäne besteht aus einem zentralen viersträngigen, gemischten β-Faltblatt und einigen umgebenden α-Helices. Sie ist auch an der Substratbindung beteiligt, jedoch nicht in wesentlichem Maße.^[108,112] Am N-Terminus der „Korken“-Domäne befindet sich eine sog. Ton-Box,

welche die Interaktion mit dem energieübertragenden Komplex TonB–ExbB–ExbD ausführt (siehe nachfolgendes Kapitel). Einige Transporter beinhalten noch eine zusätzliche *N*-terminale Signaldomäne, die an der Regulation der Eisenaufnahme beteiligt ist: Nach Substratbindung erfolgt eine konformationelle Änderung der Signaldomäne, die kaskadenartig zu einem σ -Faktor im Cytoplasma weitergeleitet wird, der die Transkription des entsprechenden Transportsystems, bei gleichzeitiger Kontrolle durch den globalen Regulator Fur, einleitet (Abb. 1-7).

Der genaue Translokationsmechanismus des Substrats ist bisher nicht verstanden. Neben dem Modell der teilweisen oder vollständigen Entfernung des „Korkens“ ist das Modell der vorübergehenden Bildung eines Kanals favorisiert, da der energetische Aufwand geringer erscheint als der, der für die Brechung von Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen notwendig wäre.^[108] Die Bildung eines transienten Kanals wurde experimentell bereits gezeigt,^[113] allerdings zeigten andere Untersuchungen die Entfernung der „Korken“-Domäne,^[114] so dass weitere Experimente zur Aufklärung des Mechanismus notwendig sind.

1.2.2 Der energieübertragende Komplex TonB–ExbB–ExbD

Der Transport von Eisen–Siderophor-Komplexen durch Membranen in ein zelluläres Kompartiment wie das Periplasma ist thermodynamisch unvorteilhaft und die äußere Membran Gram-negativer Bakterien besitzt keine direkte Energiequelle, um den Transport zu begünstigen. Daher setzen diese Organismen den TonB–ExbB–ExbD-Komplex ein, bei dem es sich um einen Energieüberträger handelt, welcher die Protonenbewegungskraft (pmf für engl.: *proton motive force*) der Cytoplasmamembran an die Transporter der äußeren Membran weiterleitet. Der Komplex ist universell für das Vitamin B₁₂- und alle Eisen–Siderophor-Aufnahmesysteme zuständig, was ihn zu einem attraktiven Ziel für potentielle neue Antibiotika macht. Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass der Komplex auch für den Import von Nickel,^[115] Kohlenhydraten^[116] und möglicherweise zahlreichen anderen Nährstoffen notwendig ist.^[117] Die einzelnen Komponenten des Komplexes sind wie folgt aufgebaut: TonB besteht aus einem kurzen cytoplasmatischen *N*-Terminus mit einer sich anschließenden einzelnen Transmembranhelix und einer großen periplasmatischen Domäne. Diese wiederum setzt sich aus einer charakteristischen Prolin-reichen Region mit zahlreichen Pro–Glu- und Pro–Lys-Wiederholungen welche den periplasmatischen Raum durchspannt und einem geordneten C-terminalen Bereich, der für die Interaktion mit dem Membrantransporter zuständig ist, zusammen. Es wurden zahlreiche Kristall- und NMR-Strukturen der C-terminalen Domäne beschrieben, die alle mehr oder minder große Unterschiede aufweisen. Während in Kristallstrukturen (teilweise verzwilligte) Dimere gefunden wurden,^[118-120] zeigte sich TonB in der NMR-Struktur als Monomere, was vermutlich seine physiologisch relevante Form darstellt.^[121]

ExbB besteht aus einem *N*-terminalen im Periplasma lokalisierten Teil, ist über drei α -Helices in der Membran verankert und besitzt zwei große cytoplasmatische Bereiche.

ExbD wiederum ist aus einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (*N*-Terminus), einer einzelnen hydrophoben Transmembranhelix und einer größeren periplasmatischen Domäne (*C*-Terminus) aufgebaut.^[122] Die NMR-Struktur der periplasmatischen Domäne wurde kürzlich gelöst und zeigt

strukturell-topologische Ähnlichkeiten mit der C-terminalen Domäne von Siderophorbindungsproteinen, auch wenn die sich daraus ergebenden biologischen Implikationen noch unklar sind.^[123]

Der genaue Vorgang der Energieübertragung ist bislang nicht verstanden. Die Transmembraneinheiten der einzelnen Proteine spielen jedoch durch ihre Interaktionen eine weitaus größere Rolle als die bloße Verankerung in der Membran. Die pmf wird durch ExbB und ExbD aufgenommen und an die Transmembrandomäne von TonB weitergegeben wodurch TonB „aufgeladen“ wird.^[108] TonB interagiert dann mit der charakteristischen Ton-Box des Membrantransporters unter Ausbildung eines intermolekularen β -Faltblatts (Abb. 1-8A). Es wird angenommen, dass so durch das energetisierte TonB eine Zugkraft auf die „Korken“-Domäne des Membrantransporters ausgeübt wird, welche ihre teilweise Entfaltung bzw. die vorübergehende Bildung eines Kanals bewirkt wird.^[124-125]

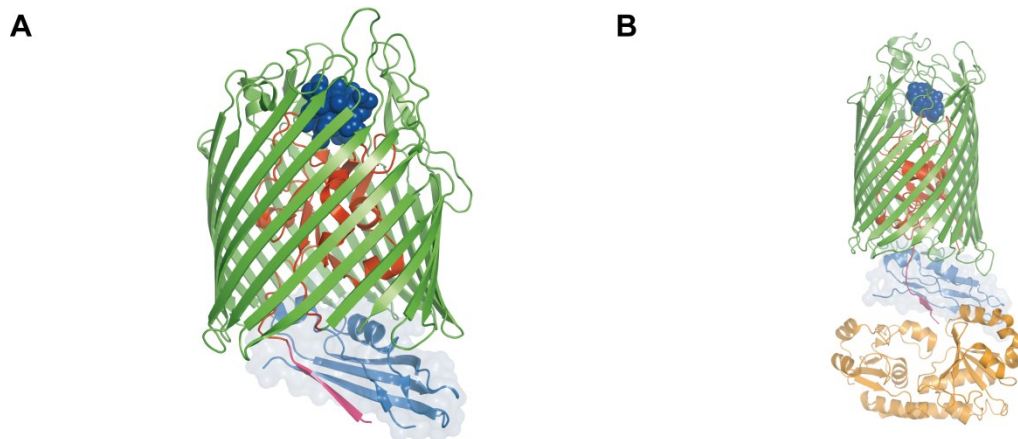


Abbildung 1-8: Interaktionen zwischen äußerem Membrantransporter, TonB und Substratbindungsprotein.

A) Interaktion zwischen dem äußeren Membrantransporter BtuB und TonB an der Ton-Box (PDB-Code: 2GSK).^[124] BtuB ist in grün/rot dargestellt, die Ton-Box in magenta. TonB ist in blau und mit Oberfläche und das Substrat Vitamin B₁₂ in dunkelblauer, raumfüllender Form dargestellt. B) Modell eines ternären Komplexes zwischen dem Substratbindungsprotein FhuD (PDB-Code: 1EFD)^[126] und dem FhuA-TonB-Komplex (PDB-Code: 2GRX),^[125] nach [127]. FhuD ist in orange dargestellt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass TonB ebenfalls mit dem nächsten Glied in der Transportkette, dem Substratbindungsprotein des ABC-Transporters, interagiert. Darüberhinaus wurde die Bildung eines ternären Komplexes aus Membrantransporter, TonB und Substratbindungsprotein experimentell gezeigt (Modell siehe Abb. 1-8B), was auf die Möglichkeit der direkten Übernahme des Substrats vom Membrantransporter durch das Substratbindungsprotein hindeutet.^[127-128]

1.2.3 ABC-Transporter und Substratbindungsproteine

ATP-Bindungskassettentransporter (ABC-Transporter) gehören zu den wichtigsten Transportsystemen in allen Lebewesen, von Bakterien und Archaeen über niedere Eukaryoten bis hin zum Menschen. Sowohl ABC-Importern als auch Exportern ist gemein, dass sie den Transport ihrer jeweiligen Substrate durch die Membran an die aus ATP-Hydrolyse gewonnene Energie koppeln.^[129]

Die allgemeine strukturelle Organisation kanonischer ABC-Transporter besteht aus zwei Transmembrandomänen (TMD), die die Translokationspermease bilden und zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD), die ATP hydrolysieren. Durch die ATP-Hydrolyse werden konformationelle Änderungen induziert, welche an die TMD gekoppelt sind und schließlich zur Translokation des entsprechenden Substrats führen.

Der Aufbau der essentiellen Komponenten ist dabei divers: Es sind sowohl Transporter bekannt, die nur aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, als auch solche wo die einzelnen Komponenten durch verschiedene Proteine gebildet werden.^[130] Prokaryotische kanonische ABC-Importer sind oftmals abhängig von hochaffinen Substratbindungsproteinen (SBP), die eine weitere essentielle Komponente derartiger Systeme darstellen. Die weitere Darstellung soll sich auf derartige bakterielle Systeme beschränken.

1.2.3.1 Substratbindungsproteine

Während Exporter ihr Substrat direkt aus dem Cytoplasma beziehen, sind bakterielle ABC-Importsysteme ultimativ auf ein Substratbindungsprotein (SBP) angewiesen, welches das Substrat an der Außenseite des Transporters positioniert. Während sie in Gram-negativen Bakterien frei im Periplasma diffundieren können (daher oft auch periplasmatische Bindungsproteine, PBPs, genannt) werden SBP in Gram-positiven Bakterien oft auch als Lipoproteine bezeichnet, da sie üblicherweise über eine *N*-terminale Lipidkette in der Membran verankert sind.^[131] Für manche Archaeen wurde eine Membranverankerung durch eine *N*-terminale hydrophobe Helix beobachtet, weiterhin sind sie manchmal mit den Transmembrandomänen fusioniert und bilden so zwei oder vier Bindungsstellen aus.^[132-133] Neben ihren Funktionen in Ligandenbindung und Transport wurde auch beobachtet, dass sie als Chaperone aktiv sein können und die Faltung denaturierter Proteine aktiv begünstigen.^[134]

SBP besitzen, unabhängig von ihren Liganden, untereinander typischerweise recht geringe Sequenzhomologien. Trotz dieser geringen Sequenzhomologien und den unterschiedlichen Größen (etwa 20-60 kDa) sind ihre dreidimensionalen Strukturen und Proteinfaltungen von großer Ähnlichkeit geprägt: Sie weisen zwei unabhängige, globuläre Domänen auf, die über verschiedene Linker miteinander verbunden sind. Die Domänen haben üblicherweise jeweils ein Rossmann-ähnliches α/β -Faltungsmotiv, wobei Variationen in Zahl und topologischer Anordnung der α -Helices und β -Stränge verschiedene Proteingrößen bei gleichzeitiger Erhaltung der Gesamttertiärstruktur erlauben. Die Spalte zwischen beiden Domänen bildet die Bindungsstelle des jeweiligen Liganden. Bisher wurden zahlreiche dreidimensionale Strukturen mit so verschiedenen Liganden wie Mono- oder Oligosacchariden, Polyoxyanionen, Aminosäuren, Di- oder Oligopeptiden, Eisen-Phosphat-Komplexen, Vitaminen, Metallionen und Siderophoren aufgeklärt.

SBP wurden 1993 von Tam und Saier anhand ihrer Sequenzidentität in acht verschiedene Cluster eingeteilt, die ebenfalls mit dem Molekulargewicht und den Ligandenbindungseigenschaften korrelierten.^[135] 2001 wurde ein zusätzlicher Cluster 9 eingeführt.^[136] Eine weitere Klassifizierung kann über die Proteintopologie erfolgen, entweder anhand der Anzahl und topologischen Anordnung

von α -Helices und β -Strängen^[137-138] oder alternativ anhand der Anzahl der Verbindungen zwischen den globulären Domänen.^[139-141] SBP der Klasse I weisen drei Verbindungen zwischen den Domänen auf, die der Klasse II zwei Verbindungen und die der Klasse III eine Verbindung. Bei den Linkern in den Klassen I und II handelt es sich meist um β -Stränge, während die einzelne Verbindung in Proteinen der Klasse III eine lange α -Helix darstellt (Abb. 1-9). SBP der Klasse III gehören grundsätzlich zu Cluster 8 und 9. Eine alternative Einteilung in sechs Cluster (mit weiteren Subclustern) erfolgte 2010 von Berntsson *et al.* aufgrund ihrer strukturellen Homologien.^[142] Die genauen Charakteristika aller Klassifizierungen und Einteilungen der SBP sind im Anhang angegeben. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Bezeichnung nach Klasse I, II und III verwendet.

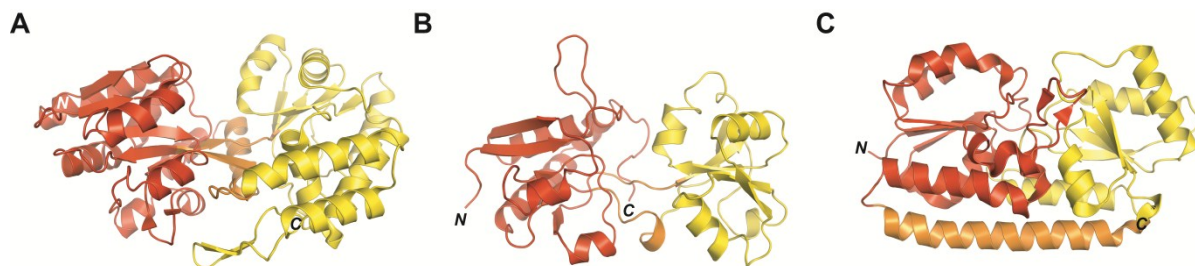


Abbildung 1-9: Repräsentative Vertreter von Substratbindungsproteinen der Klassen I, II und III.

A) Klasse I: Maltodextrin-Bindungsprotein MBP aus *Escherichia coli* (PDB-Code: 1JW4).^[143]
 B) Klasse II: Lysin/Arginin/Ornithin-Bindungsprotein LAO aus *Salmonella typhimurium* (PDB-Code: 2LAO).^[144]
 C) Klasse III: Zink-Bindungsprotein TroA aus *Treponema pallidum* (PDB-Code: 1K0F).^[145] Die (beginnend) N-terminalen Domänen sind jeweils in rot, die Linkerregionen in orange und die C-terminalen Domänen in gelb dargestellt.

SBP der Klassen I und II zeigen bei Substratbindung eine große Domänenbewegung, die auch „Pac-Man“- oder „Venusfliegenfalle“-Modell genannt wird.^[140,146] Sie kann dabei bis zu 60° betragen,^[147] wie zum Beispiel mit 35° für das Maltodextrin-Bindungsprotein (Abb. 1-10A).^[148] Mehrere Untersuchungen zeigten, dass sich die offene und geschlossene Form des Proteins in einem kinetischen Gleichgewicht befinden,^[144,149-151] bei Abwesenheit des Substrats überwiegt die offene Form bei weitem (ca. 95%).^[152] Die Bindung eines Substrates erfolgt mit Resten von beiden Domänen, daher wird das Gleichgewicht deutlich in Richtung des geschlossenen Konformers verschoben. Bei Bindung wird die Hydrathülle des Liganden entfernt und die Wassermoleküle werden aus der Bindungsspalte verdrängt, was zur Erhöhung der Entropie beiträgt. Es wird davon ausgegangen, dass nur die geschlossene Form des Proteins das Schlüsselsignal für die Interaktion mit den TMD und den nachfolgenden Transport darstellt.^[140] Die Domänenbewegung muss einerseits so groß sein, dass eine eindeutige Unterscheidung zwischen offener und geschlossener Form ebenso möglich ist, wie der freie Austausch des Liganden zwischen Bindungsspalte und Solvens. Auf der anderen Seite muss die Domänenbewegung so vorteilhaft sein, dass eine hochaffine Ligandenbindung möglich ist. Die bisher bekannten SBP der Klasse III binden Metallionen, Eisen-Siderophor-Komplexe, Häm und Vitamin B₁₂. Im Gegensatz zu den Transportern in der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, die hochspezialisiert auf ein Substrat sind, vermögen SBP eine ganze Klasse von Siderophoren, wie beispielsweise Hydroxamat- oder Catecholatsiderophore zu binden.^[108] Dies wird dadurch erreicht, dass nur der chemisch gleiche Part der Siderophore, nämlich ihre

Eisen(III)-koordinierenden Gruppen erkannt wird. Daher bindet und transportiert das Hydroxamatsiderophor-Bindungsprotein FhuD aus *E. coli* z.B. die chemisch unterschiedlichen Substrate Ferrichrom, Coprogen, Ferrioxamin B und Albomycin.^[84,126]

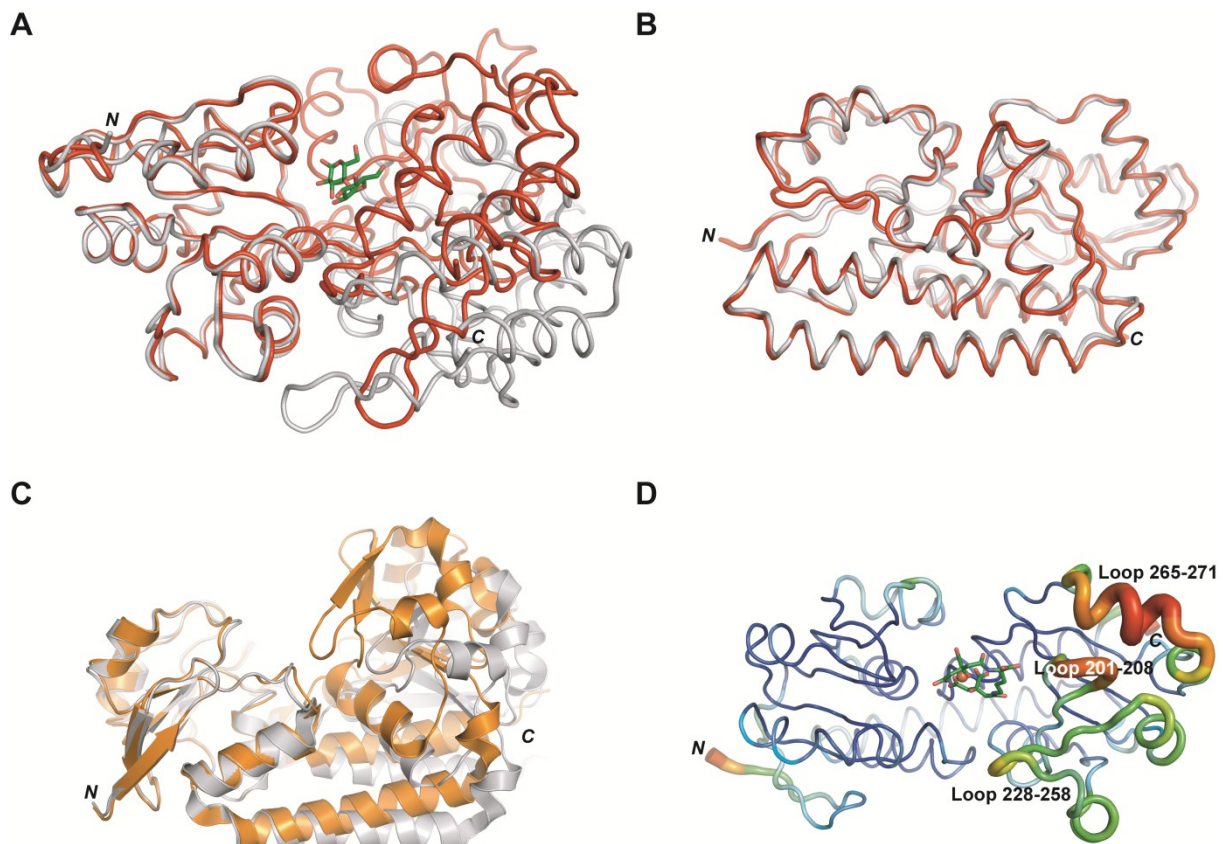


Abbildung 1-10: Domänenschließbewegung bakterieller Substratbindungsproteine.

A) Maltodextrin-Bindungsprotein MBP aus *E. coli* (PDB-Code: 1JW4 (*apo*),^[143] 1ANF (*holo*)).^[153] In den Abbildungen (A) und (B) sind die *apo*-Strukturen jeweils in grau und die *holo*-Strukturen in rot gezeigt. Die Ligandenatome sind in allen Abbildungen nach Atomen koloriert (C: grün, O: rot, N: blau, Fe: orange Kugel, Zn: graue Kugel), in den Abbildungen (A) bis (C) wurden jeweils die N-terminalen Domänen der zwei Strukturen überlagert. B) Zink-Bindungsprotein TroA aus *T. pallidum* (PDB-Code: 1K0F (*apo*),^[145] 1TOA (*holo*)).^[154] C) Siderophorbindungsprotein FitE aus *E. coli* (PDB-Code: 3BE5).^[155] Die offene *apo*-Konformation ist in grau, die geschlossene *apo*-Konformation in orange gezeigt. D) Staphyloferrin A-Bindungsprotein HtsA aus *S. aureus* in seiner offenen Konformation mit gebundenem Liganden (PDB-Code: 3LHS).^[156] Das Protein ist als B-Faktor-Röhrendiagramm gezeigt. Regionen mit erhöhten B-Faktoren zeigen einen größeren Durchmesser und sind von blau (niedriger B-Faktor) bis rot (hoher B-Faktor) koloriert (nach [156]).

Die Schließbewegung der Domänen bei Substratbindung ist in der Regel deutlich geringer als bei den SBP der Klassen I und II, da die verbrückende α -Helix Rigidität in die Proteinfaltung induziert. Die ersten bekannten Strukturen von SBP der Klasse III wiesen in der Tat eine sehr geringe Domänenbewegung auf: Das Zink(II)-Bindungsprotein TroA aus dem Syphilis-Erreger *Treponema pallidum* weist eine Domänenbewegung von etwa 4° auf, allerdings ist die *apo*-Form des Proteins noch stärker geschlossen als die *holo*-Form, da durch den Verlust des Zink(II)-Ions die Bindungstasche „kollabiert“ (Abb. 1-10B).^[145,154] FhuD und das Vitamin B₁₂-Bindungsprotein BtuF aus *E. coli* zeigen Domänenschließbewegungen von 2° bzw. 10°.^[157-158] Die größte konformationelle

Änderung der Bindungsproteine der α -Hydroxycarboxylatsiderophore Staphyloferrin A und B aus dem klinisch bedeutsamen Erreger *Staphylococcus aureus*, HtsA und SirA, wird durch die isolierte Bewegung je dreier Loops in der C-terminalen Domäne ausgeführt (Abb. 1-10D), ansonsten ist die Domänenbewegung ebenfalls sehr gering ($< 2^\circ$).^[156,159]

HtsA mit gebundenem Staphyloferrin A wurde in Kristallstrukturen sowohl in einer offenen als auch einer geschlossenen Konformation beobachtet.^[156] Des Weiteren wurden ebenfalls mehrere Konformationen von apo-FitE aus *E. coli* gefunden (Abb. 1-10C).^[155] Neben dieser experimentell beobachteten konformationellen Flexibilität legen auch Molekulardynamiksimulationen von FhuD, BtuF sowie der Häm-Bindungsproteine PhuT und ShuT aus den Pathogenen *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Shigella dysenteriae* nahe, dass die SBP der Klasse III *in vivo* weniger starre Strukturen besitzen als bisher angenommen.^[157,160-161] Die Rigidität der beobachteten Kristallstrukturen kann dabei auf sterischen Hinderungen durch Kristallkontakte beruhen. Die BtuF-Simulationen zeigten große konformationelle Änderungen für apo- und holo-Form, diese waren jedoch in der apo-Form mit einer Bewegung von 56° zwischen den beiden extremsten Konformationen stärker ausgeprägt. Die Molekulardynamiksimulationen von FhuD zeigten relativ geringe konformationelle Unterschiede von etwa 6° , weiterhin zeigten die verwandten Proteine FhuD1 und FhuD2 aus *S. aureus* bei Ligandenbindung ebenfalls nur geringfügige konformationelle Unterschiede, die durch Kleinwinkelstreuung (SAXS) experimentell festgestellt wurden.^[162-163]

Die Erkennung des Bindungsproteins durch seine kognaten TMD wird für SBP der Klasse III auf die Interaktion zwischen zwei hochkonservierten Glutamatresten des SBP mit zwei konservierten Argininresten der TMD zurückgeführt. Die Transporterkomplexstruktur wird dabei durch die Ausbildung zweier Salzbrücken stabilisiert. Erste Hinweise darauf gab eine kompetitive Peptidkartierung von FhuD und der Membranpermease FhuB^[164], die Salzbrücke wurde dann erstmals anhand der BtuF- und BtuCD-Strukturen vorgeschlagen.^[141,165]

Siderophoraufnahmestudien mit FhuD2-Mutanten zeigten die Interaktion erstmals experimentell *in vivo*.^[163] Diese wurden im Eisencitrat-Aufnahmesystem FecBCD ebenfalls durch Mutationsstudien bestätigt,^[166] schlussendliche Evidenz erbrachte allerdings erst die Kristallstruktur des BtuC₂D₂F-Komplexes, in dem die vorhergesagten Salzbrücken deutlich ausgeprägt waren (Abb. 1-11).^[167] Während gebundene Metallionen von ihren kognaten SBP komplett verdeckt und eingeschlossen werden,^[154,168-169] sind Siderophore, Vitamin B₁₂ und Häm zu einem erheblichen Teil solvensexponiert. Daher wurde ebenfalls angenommen, dass Teile des Siderophors zusammen mit den konservierten Glutamatresten eine Erkennungs- und Interaktionsfläche für die TMD bilden, also direkt an der Erkennung beteiligt und essentiell für diese sind.^[163]

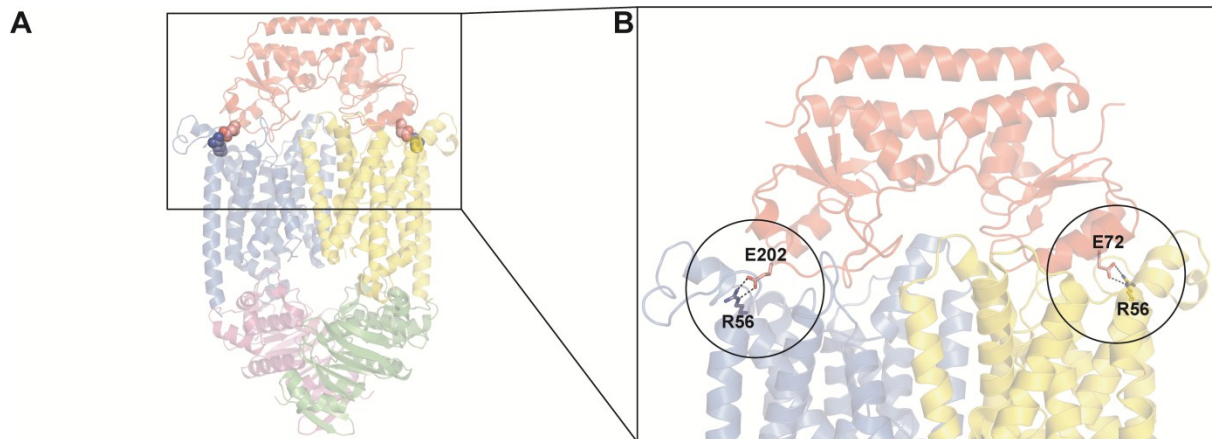


Abbildung 1-11: Salzbrücken zwischen Substratbindungsprotein und Transmembrandomänen in der Kristallstruktur des Vitamin B₁₂-Transporters BtuC₂D₂F.

A) Seitliche Ansicht des Transporterkomplexes. Das SBP ist in rot, die TMD in blau bzw. gelb und die NBD in grün bzw. violett dargestellt. Die die Salzbrücken formenden Reste sind raumfüllend dargestellt und nach Atomen eingefärbt (C: Farbe des jeweiligen Proteinrückgrats, O: rot, N: blau). B) Zoom auf die Salzbrücken-formenden Reste, die als Stabmodell dargestellt sind (PDB-Code: 2QI9).^[167]

Eine selektive Erkennung der *holo*-Form ist notwendig, da die Zahl der SBP im Periplasma Gram-negativer Bakterien etwa zehnmal größer ist als die der zugehörigen Membrantransporter.^[2,140] Weiterhin müssen SBP den Anspruch einer hochaffinen Ligandenbindung erfüllen, gleichzeitig jedoch auch in der Lage sein, das jeweilige Substrat im Lauf des Transportprozesses an die Membranpermease abzugeben. Wie groß die konformationellen Unterschiede zwischen *apo*- und *holo*-Formen von SBP der Klasse III sind, wie die TMD zwischen den beiden Formen unterscheiden können und wie die Bindung des Substrats gelöst wird ist trotz der zuvor dargelegten Untersuchungen (oder gerade wegen der teils widersprüchlichen Resultate) nach wie vor strittig und Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.2.3.2 Transmembrandomänen

Die Transmembrandomänen (TMD) bestehen meist aus 4-10 α -Helices, welche die Membran durchspannen (daher oft auch MSD für engl.: *membrane spanning domains*). Die Loops, welche die Helices an der intra- und extrazellulären Seite miteinander verbinden, sind von variabler Länge und essentiell für die Erkennung durch den jeweiligen Interaktionspartner.^[129] Die TMD formen die Translokationspore, durch die das Substrat nach Abgabe durch das SBP transportiert wird. Die Reste innerhalb der Pore sind dabei hydrophiler Natur, während die membranexponierten Reste auf der Außenseite der Helices hydrophob sind. Obwohl die Sequenzhomologie zwischen verschiedenen TMD eher gering ist, kann sie innerhalb einer Transporter-Klasse, wie beispielsweise für Eisenchelatkomplexe, sehr hoch sein. So sind innerhalb dieser Klasse mehrere Argininreste, die mit ebenfalls konservierten Glutamatresten des SBP interagieren, durchgängig vorhanden.

1.2.3.3 Nukleotidbindungsdomänen

Die NBD sind die treibende Kraft der ABC-Transporter und stellen damit gewissermaßen ihren „Motor“ dar. Sie sind grundsätzlich im Cytoplasma lokalisiert und interagieren mit den TMD. Sie bestehen aus einer RecA-ähnlichen und einer α -helikalen Subdomäne, die durch zwei flexible Loops miteinander verbunden sind. Die Faltung ist insgesamt hochkonserviert, wobei man die RecA-ähnliche Subdomäne auch in anderen ATPasen findet, während die α -helicale Subdomäne hingegen spezifisch für die ABC-Transporter ist.^[129-130,170-171] Die RecA-ähnliche Subdomäne enthält beide sog. Walker-Motive, die spezifisch für ATP-bindende Proteine sind sowie die konservierten D- und H-Loops (auch Switch genannt). Der hochflexible Q-Loop trägt einen konservierten Glutaminrest und verbindet beide Subdomänen. Da er an den Interaktionsflächen sowohl mit dem NBD-Dimer als auch mit den TMD wechselwirkt, wirkt er möglicherweise an der Interdomänensignalgebung mit.^[172] In der α -helikalen Subdomäne befindet sich das sog. LSGGQ-Motiv, das als Erkennungsmotiv der ABC-Familie angesehen wird.

Manche NBD wie z.B. MalK aus dem Maltose-Transporter von *E. coli* besitzen eine zusätzliche C-terminale Regulationsdomäne, die den Kontakt zwischen den Monomeren unabhängig vom Zustand der ATP-Beladung und der Konformation der NBD aufrecht erhält (Abb. 1-12).^[173]

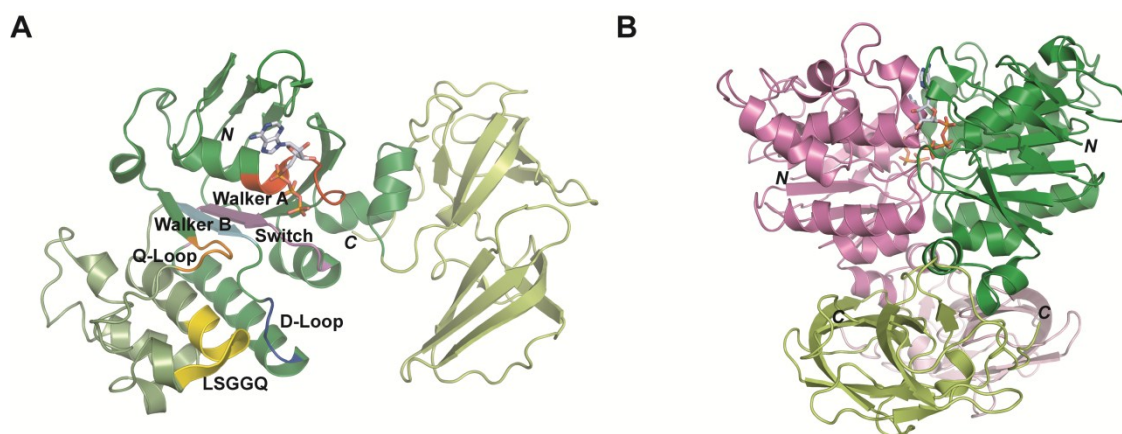


Abbildung 1-12: Kristallstruktur der ATP-Bindungskassette MalK.

A) Monomer der NBD MalK aus dem Maltose-Transporter von *E. coli* (PDB-Code: 1Q12). Die RecA-ähnliche Subdomäne ist in dunkelgrün, die α -helicale Subdomäne in grau-grün und die Regulationsdomäne in hellgrün dargestellt. Die konservierten Motive sind folgendermaßen gekennzeichnet: Walker A (rot), Q-Loop (orange), LSGGQ (gelb), Walker B (türkis), D-Loop (blau), Switch (violett). ATP ist als Stabmodell dargestellt (C: hellgrau, O: rot, N: blau, P: orange). B) Dimer des oben genannten Transporters. Die MalK-Monomere sind in grün und violett gezeigt, die Regulationsdomänen sind dabei in einer jeweils helleren Farbschattierung dargestellt.

Die ATPase-Aktivität der Domänen ist hochkooperativ, was mit der dimeren Anordnung der NBD korreliert, die durch mehrere Kristallstrukturen bestätigt wurde. Diese weisen weiterhin ein „Nukleotidsandwich“ auf, in welchem ATP zwischen der Domänengrenzfläche vom Walker A-Motiv des einen Monomers und dem LSGGQ-Motiv des anderen Monomers gebunden ist.^[174-175] Die Domänenbewegung durch ATP-Hydrolyse und Freisetzung der Produkte führt in der Folge zu konformationellen Veränderungen der TMD.

1.2.3.4 Funktion und Mechanistik

Nachdem es zunächst gelungen war die einzelnen Komponenten von ABC-Transportern funktionell und strukturell zu charakterisieren, gab es in den letzten Jahren große Fortschritte bei der Charakterisierung intakter Transporterkomplexe. Neben „klassischen“ biochemischen Untersuchungen erbrachten insbesondere strukturelle Informationen über die Transporter in verschiedenen Zuständen und Konformationen Erkenntnisse die zur Postulierung bzw. weiteren Erklärung der Transportmechanismen führten. Neben dem Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F (Abb. 1-11) existieren zwei weitere Kristallstrukturen vollständig intakter ABC-Systeme, namentlich die des Maltodextrintransporters MalEFGK₂ aus *E. coli*^[176] und die des putativen Molybdattransporters ModAB₂C₂ aus *Archaeoglobus fulgidus* (Abb. 1-13).^[177]

Grundsätzlich erfolgt der Transport durch eine von den NBD ausgehenden und in den TMD induzierten Konformationsänderung. Die NBD sind die am stärksten konservierten Komponenten des Transporters und somit die allgemeine „Antriebsfeder“ die mit verschiedenen Transportern verknüpft sein kann. Die zwei NBD formen zusammen in einer Kopf-Schwanz-Anordnung zwei ATP-Bindungs- und Hydrolysestellen, sind also nur als Dimer funktionell. Nach ATP-Bindung schließt sich die Interaktionsfläche zwischen beiden Domänen und die Nukleotide sind jeweils durch beide NBD gebunden.^[175] Dies geht einher mit Wechselwirkungen der NBD mit strukturell konservierten Kopplungshelices der TMD, was in der Folge zu einer nach außen geöffneten Konformation der TMD führt. Der Transporter ModAB₂C₂ wurde in einer nukleotidfreien, nach außen geschlossenen Konformation kristallisiert (Abb. 1-13A)^[177] und der Multiwirkstoffexporter Sav1866 aus *S. aureus* in nukleotidgebundener, nach außen offener Konformation (Abb. 1-13C),^[178] woraus der prinzipielle Mechanismus der Kopplung von ATP-Bindung und Hydrolyse an den Transportprozess abgeleitet wurde.

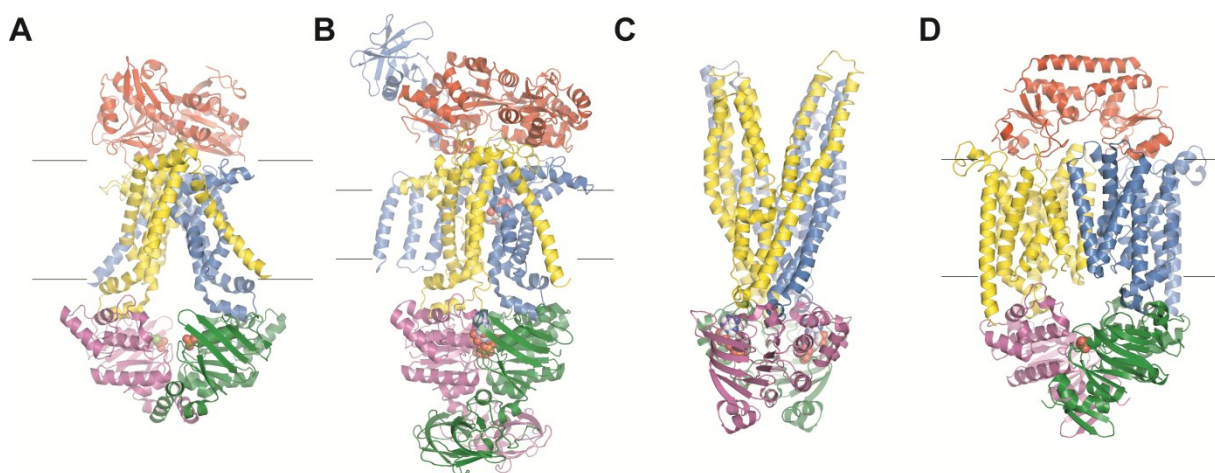


Abbildung 1-13: Kristallstrukturen bakterieller ABC-Transporter.

A) Molybdattransporter ModAB₂C₂ aus *A. fulgidus* (PDB-Code: 2ONK)^[177] in einer nukleotidfreien Konformation, die eine nach innen gerichtete Öffnung der TMD bewirkt. In dieser und den anderen Strukturen ist das SBP in rot, die TMD in gelb und blau und die NBD in violett und grün dargestellt, die jeweiligen Substrate und Cofaktoren sind in raumfüllender Darstellung gezeigt. B) Maltodextrintransporter MalEFGK₂ aus *E. coli* (PDB-Code: 2R6G).^[176] C) Multiwirkstoffexporter Sav1866 aus *S. aureus* (PDB-Code: 2HYD).^[178] D) Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F aus *E. coli* (PDB-Code: 2QI9).^[167]

Der Maltodextrintransporter MalEFGK₂ wurde in einem katalytisch intermediären Zustand kristallisiert (Abb. 1-13B). Der Komplex wies gebundenes ATP und eine nach außen offene Konformation auf, die Öffnung wurde jedoch noch durch das gebundene SBP MalE blockiert, welches die Freigabe von Maltose nach außen verhinderte. Eine wiederum andersartige Konformation nimmt der Vitamin B₁₂-Transporter BtuC₂D₂F ein (Abb. 1-13D),^[167] der allerdings auch zu einer anderen Klasse der Importer gehört. Daher ist es möglich, dass die fehlende Korrelation zwischen Nukleotidbindungsstatus und der Konformation der TMD entweder auf die Reinigungs- und Kristallisationsbedingungen oder auf einen anderen *modus operandi* zurückzuführen ist.^[179-180]

1.3 Eisenhomöostase in *Bacillus subtilis*

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit befassen sich ausschließlich mit dem Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, daher soll seine Eisenhomöostase im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Bei *B. subtilis* handelt es sich um ein Gram-positives, stäbchenförmiges Bakterium, das aufgrund seines hohen Verwandtschaftsgrads zu pathogenen Mikroorganismen wie *B. cereus* und *B. anthracis*, seiner eigenen Nicht-Pathogenität und seiner leichten genetischen Zugänglichkeit als Modellorganismus verwendet wird. Seine Eisenhomöostase wird im Wesentlichen durch den globalen Transkriptionsregulator Fur (engl.: *ferric uptake repressor*) gesteuert.^[25] Fur reguliert, abhängig von der Eisen(II)-Konzentration in der Zelle, die Expression der am Eisenhaushalt beteiligten Gene. Es enthält eine Bindungsstelle, die mit Eisen(II) besetzt werden kann und eine konformationelle Änderung des Regulators hervorruft, so dass dieser als Dimer an die entsprechenden Promotorregionen der Zielgene bindet.^[181] Entsprechende Kristallstrukturen sind bisher für die Fur-Orthologen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Vibrio cholerae* bekannt, allerdings ohne die entsprechenden DNA-Sequenzen, so dass der genaue Erkennungs- und Regulationsmechanismus offen bleibt.^[182-183] Die Kontrolle von Fur umfasst mindestens 20 Operons mit insgesamt 39 Genen,^[184] die hauptsächlich – wie das *dhb*-Operon – an der Siderophor-Biosynthese beteiligt sind^[25-26] oder für Eisentransportsysteme codieren.^[185] Weiterhin ist Fur in der Lage eine „Eisensparantwort“ zu koordinieren, da es drei Operons kontrolliert, die für eine sRNA und drei kleine Proteine (mutmaßlich RNA-Chaperone) codiert, die in der Folge die Produktion eisenabhängiger Proteine deutlich reduzieren.^[186]

Die Siderophor-abhängige Eisenaufnahme in *B. subtilis* beginnt mit der Assemblierung des Siderophors Bacillibactin durch die Genprodukte des *dhb*-Operons. Der Export des *apo*-Siderophors erfolgt durch den MFS-Transporter (engl.: *major facilitator superfamily*) YmfD (In der ursprünglichen Annotierung des *B. subtilis*-Genoms^[187] wurde *ymfD* noch als *ymfE* bezeichnet, die neue Annotierung^[188] führte *ymfE* zusammen mit dem Gen *ymfD*.), der als einziges der bisher bekannten zentralen Proteine nicht Fur-reguliert ist. Die Steuerung der Genexpression erfolgt in diesem Fall durch den positiven Transkriptionsregulator Mta (engl.: *multidrug transporter activator*),^[189] der neben YmfD noch weitere MFS-Transporter reguliert.^[190] Nach Export und Bildung seines Eisenkomplexes wird Bacillibactin durch den FeuABC-YusV₂-Transporter wieder in die Zelle importiert.^[185,191] Das zugehörige *feuABC-ybbA*-Operon wird durch Fur und den positiven

Transkriptionsregulator Btr (engl.: *Bacillibactin transport regulator*) gesteuert. Btr vermag durch seine C-terminale Domäne apo- und holo-Bacillibactin zu binden, woraufhin die N-terminale Domäne die Transkription des Operons induziert.^[192]

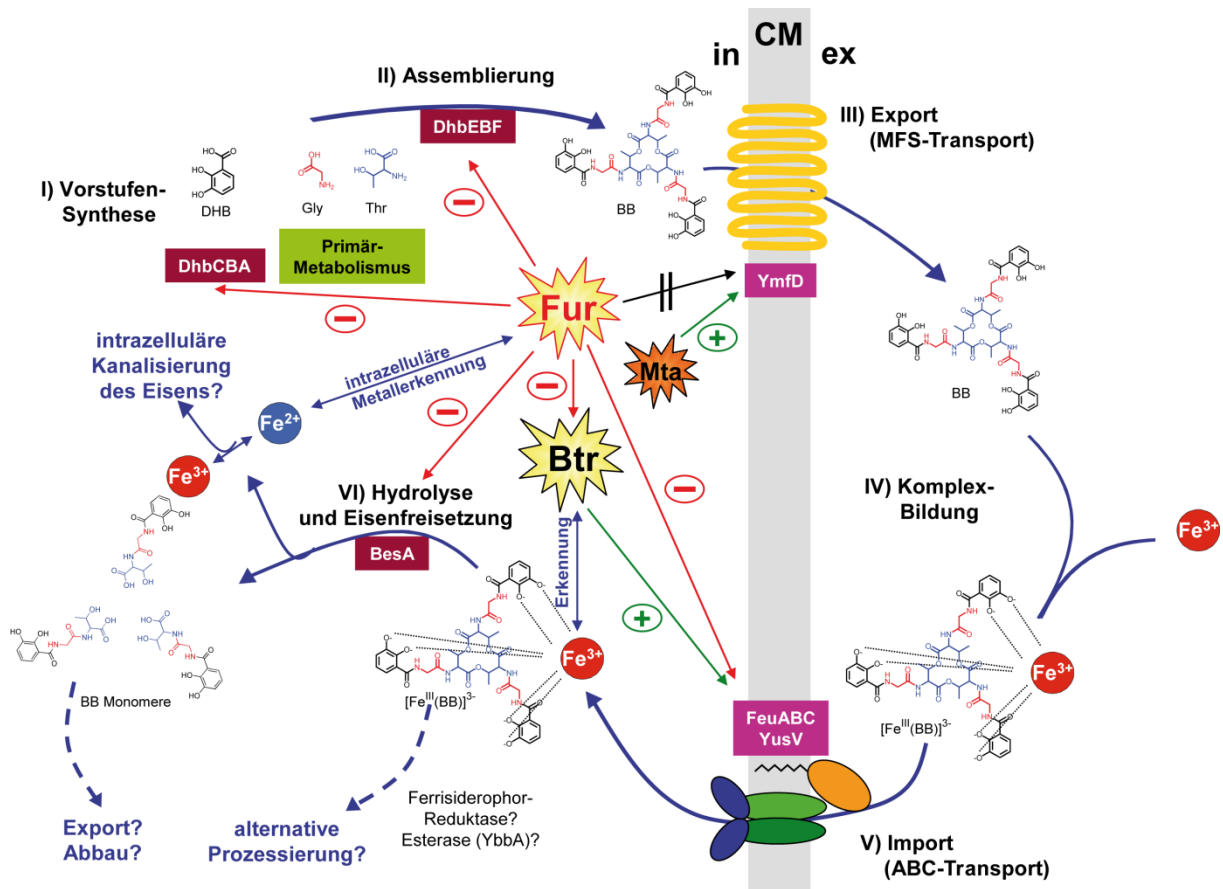


Abbildung 1-14: Pfad der Bacillibactin-abhängigen Eisenaufnahme in *Bacillus subtilis* (ergänzt, nach [193]).

CM: Cytoplasmamembran. in: intrazellulärer Raum. ex: extrazellulärer Raum.

Die Eisenaufnahme aus Bacillibactin erfolgt durch die α,β-Hydrolase BesA (Bacillibactin Esterase A), eine analoge Funktion wird für das bisher nicht charakterisierte Enzym YbbA vermutet.^[191,194] Über die Eisenaufnahme aus anderen, nicht hydrolysierbaren Siderophoren sowie über die Metabolisierung der Bacillibactin-Monomere ist bisher nichts bekannt, daher sind diese Themen Gegenstand derzeitiger und zukünftiger Untersuchungen. Es ist allerdings seit langem bekannt, dass *B. subtilis* unter Eisenmangelbedingungen ebenfalls 2,3-DHB und sein Glycinkonjugat, die sogenannte Itosche Säure, sekretiert.^[195-197] Die Bacillibactin-abhängige Eisenaufnahme in *B. subtilis* ist zusammenfassend in Abb. 1-14 dargestellt, weitere Informationen über einige der beteiligten Proteine sind im Anhang angegeben.

Neben FeuABC–YusV₂ existieren zahlreiche weitere ABC-Transporter, die für den Import verschiedener anderer Siderophore verantwortlich sind. So importiert YfmCDEF₂ Eisencitrat, YfiYZ–YfhA–YusV₂ Schizokinen, Arthrobactin und Coprogen^[185] und der Transporter FhuBGC₂ Ferrichrom unter Verwendung des Substratbindungsproteins FhuD,^[198] sowie Ferrioxamin bei Verwendung von YxeB.^[185] Das Substrat des Transporters YclNOP₂Q war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht bekannt. Zusätzlich existiert ein siderophorunabhängiges Eisenaufnahmesystem, bestehend aus der Membranpermease YwbL, dem Eisenbindungsprotein YwbM sowie der Peroxidase YwbN (Abb. 1-15).

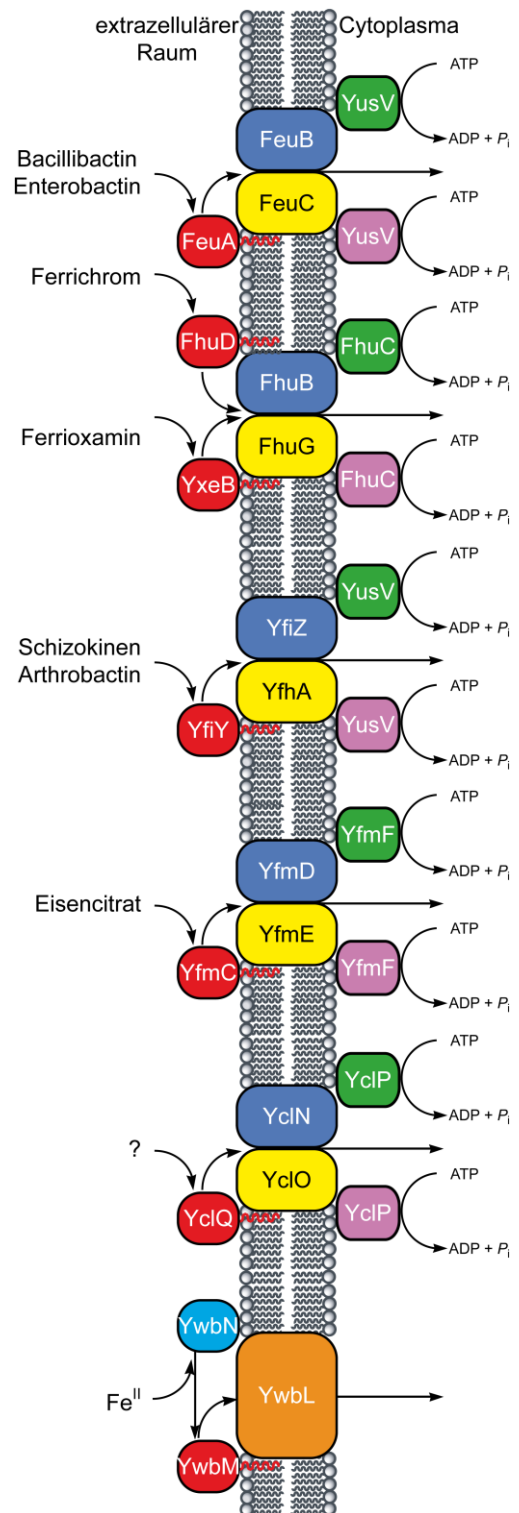


Abbildung 1-15: Eisentransportsysteme in *Bacillus subtilis*.

1.4 Aufgabenstellung

Die genaue Funktion distinkter Substratbindungsproteine ist in zahlreichen Organismen noch unbekannt und die in den Datenbanken zugeordneten Substrate dieser Proteine stützen sich oftmals nur auf Homologien zu bekannten Proteinen anderer Organismen. Diese Zuordnung wird zusätzlich durch die meist sehr geringen Sequenzhomologien der SBP erschwert und in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Biochemisch und physiologisch bereits charakterisierte SBP stellen hingegen eine gute Ausgangsbasis für weitergehende Untersuchungen dar, da die molekularen Details der Siderophorbindung nur in wenigen Fällen aufgeklärt und verstanden sind.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Identifizierung sowie der strukturellen und funktionellen Charakterisierung bakterieller Substratbindungsproteine. Zunächst sollte das SBP für Petrobactin in *B. subtilis* mit Hilfe synthetischer Petrobactinanaloga unter Verwendung eines Affinitätschromatographischen Verfahrens isoliert und identifiziert werden. Die anschließende biochemische und physiologische Charakterisierung sollte die zugeordnete Rolle des Proteins bestätigen. Weiterhin sollte das SBP FeuA durch Kristallisation und Röntgenkristallographische Methoden strukturell charakterisiert und der genaue Bindungsmodus verschiedener Substrate aufgeklärt werden. Dabei sollten insbesondere die stereochemischen Unterschiede der Substrate beachtet und mit spektroskopischen Methoden weiter untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Autoklav	5075 ELV (<i>Tuttnauer</i>) Autoclavi SPA FVA3/A1 (<i>Fedegari</i>)
Analysenwaage	MC 210 S (<i>Sartorius</i>)
Bidestillationsanlage für Wasser	Seralpur Pro90CN (<i>Seral</i>)
Brutschrank	2736 (<i>Köttermann</i>)
CD-Spektropolarimeter	J-810 (<i>Jasco</i>)
Clean-Bench	Antair BSK
Dokumentationseinheit für	CS1 Videokamera (<i>Cybertech</i>)
DNA- Agarosegele	Video Copy Processor Thermodrucker (<i>Mitsubishi</i>)
Elektrophoresekammern	Agarosegelkammer (<i>Feinmechanische Werkstätten, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg</i>) MiniProtean 3 Gelkammer (<i>Bio-Rad</i>)
Elektroporationspulser	Gene Pulser II Electroporator (<i>Bio-Rad</i>)
Emulsifier	EmulsiFlex C5 (<i>Avestin</i>)
FPLC-Systeme	FPLC-System 250: Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-100 (<i>Amersham Pharmacia</i>); Äkta®prime (<i>Amersham Pharmacia Biotech</i>); Äkta®purifier-System: Box 900, Fraktionskollektor Frac900, Monitor pH/C-900, Monitor UV-900, Pumpe P-900 (<i>Amersham Pharmacia Biotech</i>)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LSC (<i>Christ</i>)
Gelschüttler	UNIMAX 2010 (<i>Heidolph</i>)
Heizschüttler	Thermomixer comfort (<i>Eppendorf</i>)
HPLC-System	Agilent series 1100 HPLC-System: Vakuumentgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor, HP-Chemstation Software (<i>Agilent</i>)
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys™ SQ4000 (<i>Genomic Solutions</i>)
Liquid handling-System	Lissy (<i>Zinsser Analytic</i>)

LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer	<i>(Thermo Fischer Scientific)</i>
Luftschüttler	Series 25 Incubator Shaker <i>(New Brunswick Scientific)</i> , Innova 4300 Incubator Shaker <i>(New Brunswick Scientific)</i> , Multitron II <i>(Infors HT)</i> , Unitron <i>(Infors HT)</i>
MALDI-TOF-Massenspektrometer	Biflex III <i>(Bruker)</i>
Mikroskope	B061 <i>(Olympus)</i> , MZ8 <i>(Leica)</i> , S6D <i>(Leica)</i>
PCR-Thermocycler	Mastercycler Personal <i>(Eppendorf)</i>
pH-Meter	CG 840 <i>(Schott)</i> , SevenEasy <i>(Mettler Toledo)</i>
Photometer	Ultrospec® 3100 pro <i>(Pharmacia Biotech)</i> NanoDrop™ 1000 <i>(Thermo Scientific)</i>
Pipetten	Reference-Serie <i>(Eppendorf)</i>
Q-TOF-Massenspektrometer	API QStar Pulsar i <i>(Applied Biosystems)</i>
Röntgendiffraktometer	Drehanode AXS FR591 <i>(Bruker)</i> MAR245dtb Detektor <i>(MAR Research)</i> Oxford Cryosystems <i>(Oxford)</i>
Strom- und Spannungsquellen	E132 <i>(Consort)</i> ,
Ultraschall-Sonotrode	Sonoplus HD 200 <i>(Bandelin)</i>
Ultrazentrifuge	CENTRIKON T-2070, Rotor: TH641 <i>(Kontron Ultracentrifuge)</i>
Vortexer	Vortex Genie 2 <i>(Scientific Industries)</i>
Waagen	BP410 <i>(Sartorius)</i> , SI-2002 <i>(Denver Instrument)</i>
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D <i>(Eppendorf)</i> Centrifuge 5702 R <i>(Eppendorf)</i> RC-5B Plus, Rotoren: SLA-3000, SLC-4000 <i>(Sorvall)</i> RC-26 Plus, Rotor: SS-34 <i>(Sorvall)</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Dialyseeinheiten	Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes, MWCO 10000 Da (<i>Thermo Scientific</i>)
Dialysemembranen	Porengröße: 0.025 µm, Durchmesser: 25 mm (<i>Millipore</i>)
Dialyseschlauch	Spectra/Por® 3 Regenerated Cellulose Dialysis Membranes (MWCO: 3500 Da)
Einmalküvetten	Halb-Mikro-Küvette 10 × 4 mm, Lichtweg 10 mm (<i>Sarstedt</i>)
Entsalzungssäulen	illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator (<i>GE Healthcare</i>)
Elektroporationsküvetten	2 mm Elektroporationsküvette (<i>Eurogentec</i>)
Kit für Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit (<i>Qiagen</i>)
Kit für DNA-Reinigung	QIAquick PCR Purification Kit (<i>Qiagen</i>)
Kit für Mini-Plasmidpräparation	QIAprep Spin Miniprep Kit (<i>Qiagen</i>)
Kristallisationsscreens	NeXtal Classics Suite, Classics Lite Suite, Cryo Suite, Anions Suite, MbClass I+II Suite, PACT Suite, JCSG+ Suite, Classics II Suite, CompAS Suite (<i>Qiagen</i>)
Kristallisationszubehör	24 well EasyXtal Crystallization Tool (<i>Qiagen</i>) 96 well Innovaplate™ SD-2 (<i>Innovadyne</i>) Cryoschleifen, -zangen, CrystalWand™, Micro-Tools™ und Zubehör (<i>Hampton Research</i>) Deckgläser, 22 mm (<i>Hampton Research</i>) SilverSeal-Klebefolien (<i>Greiner Bio-One</i>) VIEWseal™-Klebefolien (<i>Greiner Bio-One</i>)
Konzentratoren	Amicon® Ultra – 15 Centrifugal Filter Devices (<i>Millipore</i>)
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i>
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5 und 2,0 mL (<i>Eppendorf</i>)
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S 0.2 µm und 0.4 µm (<i>Sarstedt</i>)
Sterilfilter	Ultrafree-MC 0.22 µm (<i>Millipore</i>)

2.3 Chemikalien

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

Produkt	Hersteller
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	<i>Roth</i>
Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen, Eurogentec</i>
Amberlite™ XAD-16	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ampicillin	<i>AppliChem</i>
Bacto®-Trypton und -Hefeextrakt	<i>AppliChem</i>
Borsäure	<i>Merck</i>
Bradford-Reagenz	<i>Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)</i>
Coomassie-Brilliant Blue G250	<i>Serva</i>
Coomassie-Brilliant Blue R250	<i>Serva</i>
2,5-DHB-Matrix	<i>Agilent Technologies</i>
Desoxyribonukleotide	<i>New England Biolabs</i>
DNA-Leiter	<i>1 kb-, 100 bp-, 2-log-DNA-Leiter (New England Biolabs)</i>
EDTA (Na ₂ EDTA·2 H ₂ O)	<i>Merck</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
D-(+)-Glucose Monohydrat	<i>Merck</i>
Glycerin	<i>Roth</i>
Guanidiniumchlorid	<i>Acros Organics</i>
HEPES	<i>Roth</i>
IPTG	<i>AppliChem</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Roth</i>
Natriumdodecylsulfat	<i>Serva</i>
Ni ²⁺ -NTA Superflow®	<i>Qiagen</i>
Protein-Marker	<i>PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas)</i> <i>Protein Marker, Broad Range 2-212 kDa (New England Biolabs)</i>
Tris	<i>Roth</i>
Tween® 20	<i>Roth</i>

Alle anderen, nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen *Merck*, *Aldrich*, *Fluka* oder *Roth* in p.a.-Qualität bezogen. Alle zur Kristallisation verwendeten Chemikalien wurden in höchster kommerziell erhältlicher Reinheit bezogen.

2.4 Enzyme

Tabelle 2-4: Für Klonierungsarbeiten verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
Antarktische Phosphatase (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs
Benzonase® Endonuklease (c = ≥ 250 U μL^{-1})	Merck
BSA (c = 10 mg mL^{-1})	New England Biolabs
HindIII (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs
NcoI (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs
NdeI (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (c = 2 U μL^{-1})	Finnzymes
T4-DNA-Ligase (c = 400 U μL^{-1})	New England Biolabs
Taq-Polymerase (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs
XhoI (c = 5 U μL^{-1})	New England Biolabs

U: Units (Enzymeinheiten) nach Herstellerangaben.

2.5 Oligonukleotidprimer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, Deutschland) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2-5: Oligonukleotidprimer zur Klonierung, Erstellung einer Deletionsmutante und zur ortsgerechten Mutagenese.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Zielgen	Restriktionsenzym bzw. Mutation
FP_yclQ_NdeI_NHis6_Fwd	AAACATATGGGAAACCAAAGCA CAAGCAGC	yclQ	NdeI
FP_yclQ_XhoI_NHis6_Rev	TTTCTCGAGTTACTTTTCTAAA CCGTCTTTCAC	yclQ	XhoI
FP_yclQ_NcoI_CHis6_Fwd	AAACCATGGGAAACCAAAGCAC AAGCAGC	yclQ	NcoI
FP_yclQ_XhoI_CHis6_Rev	TTTCTCGAGCTTTTCTAAACCG TCTTTCAC	yclQ	XhoI
AA_dyclQ_kan_p1	CCTGGCGAGAGAATTCCTGAAA ACATAT	yclQ	
AA_dyclQ_kan_p2	CATACCTCGGTATAATCTTACC TATCACCTGCTCCTCACCTCTT CTATATATTAAGAAAAATAA	yclQ	
AA_dyclQ_kan_p3	ATCCGCAACTGTCCATACTCTG ATGTTTTATAAAACCAAAAAGA GCCTCCGCTAAATAG	yclQ	

AA_dyclQ_kan_p4	GAAGCTTTCTCTTGGAGATCAT TGTTTTATATTA	<i>yclQ</i>	
FP_FeuA_K84A_Fwd	GCCGAACCAACCGGAGAA <u>GCAA</u> TGGAGCCAAATATTGAAA	<i>feuA</i>	K84A
FP_FeuA_K84A_Rev	TTTCAATATTTGGCTCCAT <u>TGC</u> TTCTCCGGTTGGTTCGGC	<i>feuA</i>	K84A
FP_FeuA_K105A_Fwd	GTTATCCTTGCTTCAACA <u>GCGT</u> TTCCGGAAAAACGCTGC	<i>feuA</i>	K105A
FP_FeuA_K105A_Rev	GCAGCGTTTTTCCGGAAA <u>CGC</u> TGTTGAAGCAAGGATAAC	<i>feuA</i>	K105A
FP_FeuA_K178A_Fwd	TCATT <u>GCA</u> ATTAGACAAGGCAA CATTTACATTTACCCCTGA	<i>feuA</i>	R178A
FP_FeuA_K178A_Rev	CTAAT <u>TGCA</u> ATGACTAAAGCTT TTGAATCTTTCGCTTTAT	<i>feuA</i>	HindIII, R178A
FP_FeuA_K180A_Fwd	GAATT <u>GCA</u> CAAGGCAACATTTA CATTTACCCCTGAACAGGT	<i>feuA</i>	R180A
FP_FeuA_K180A_Rev	CCTTG <u>TGCA</u> ATTCTAATGACTA <u>AAGCTTTTGAATCTTTTCG</u>	<i>feuA</i>	HindIII, R180A
FP_FeuA_K213A_Fwd	AACGAAGTAAAGGCTGCAG <u>GCA</u> G CGCAAGAGCTGAGTTCAT	<i>feuA</i>	K213A
FP_FeuA_K213A_Rev	ATGAACCTCAGCTCTTGC <u>GCTGC</u> TGCAGCCTTTACTTCGTT	<i>feuA</i>	K213A

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Überhänge für Resistenzkassetten sind kursiv und unterstrichen, Mutationsstellen sind fett und unterstrichen.

2.6 Vektoren

2.6.1 pET-28a(+)

Standardmäßig wurde pET-28a(+) als Vektor zur Produktion rekombinanter Proteine eingesetzt. Ein N- oder C-terminaler His₆-tag wird durch den Vektor nach Ligation des gewünschten Gens eingeführt, der eine Ni²⁺-NTA-gestützte Proteinreinigung möglich macht. Die enthaltenen T7-Promotor- und T7-Terminatorsequenzen ermöglichen die Transkription des eingeführten Gens durch die T7-RNA-Polymerase. Diese wird durch die IPTG-gesteuerte Dissoziation des *lac*-Repressors von der *lac*-Operatorsequenz induziert (Abb. 2-1).

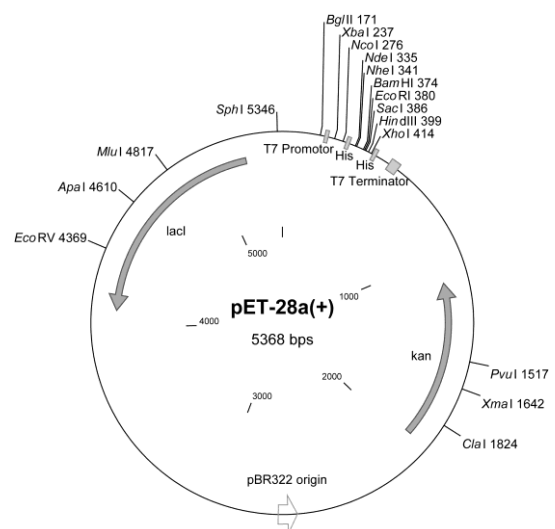


Abbildung 2-1: Vektorkarte von pET-28a(+).

2.6.2 pCB-28a(+)

Weiterhin wurde der Vektor pCB-28a(+) eingesetzt, welcher ein pET-28a(+)-Derivat ist. Dieser trägt einen verkürzten Linker (fehlende Basenpaare: 317-373) zwischen dem N-terminalen His₆-tag und der eingeführten Nukleotidsequenz, wodurch die Schnittstelle für die Protease Thrombin entfernt wurde. Die sonstigen Charakteristika entsprechen denen von pET-28a(+) (Abb. 2-2).

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide ist in Tab. 2-6 angegeben.

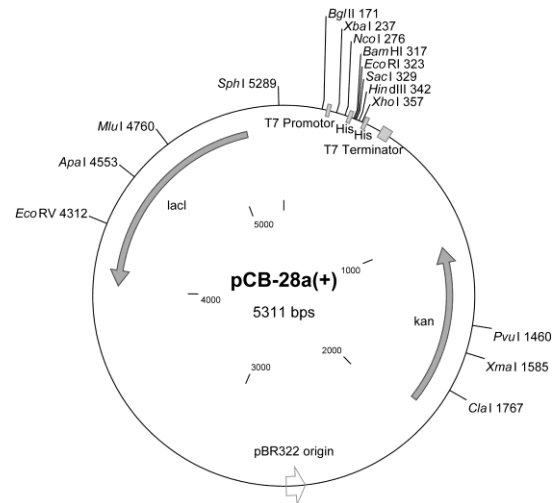


Abbildung 2-2: Vektorkarte von pCB-28a(+).

Tabelle 2-6: In dieser Arbeit verwendete Expressionsplasmide.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pOK01	pCB-28a(+), der <i>feuA</i> als C-terminales His ₆ -Fusionskonstrukt enthält und dem die ersten 20 Codons des annotierten Gens fehlen	[191,194]
pFP007	Variation von pOK01 mit der Punktmutation K84A	diese Arbeit, [199]
pFP008	Variation von pOK01 mit der Punktmutation K105A	diese Arbeit, [199]
pFP009	Variation von pOK01 mit der Punktmutation R178A	diese Arbeit, [199]
pFP010	Variation von pOK01 mit der Punktmutation R180A	diese Arbeit, [199]
pFP011	Variation von pOK01 mit der Punktmutation K213A	diese Arbeit, [199]
pFP012	pET-28a(+), der <i>fpiA</i> (<i>yclQ</i>) als N-terminales His ₆ -Fusionskonstrukt enthält und dem die ersten 20 Codons des annotierten Gens fehlen	diese Arbeit, [200]
pFP013	pCB-28a(+), der <i>fpiA</i> (<i>yclQ</i>) als C-terminales His ₆ -Fusionskonstrukt enthält und dem die ersten 20 Codons des annotierten Gens fehlen	diese Arbeit, [200]

2.7 Mikroorganismen

2.7.1 *Bacillus subtilis* Marburg 168

Der Stamm *B. subtilis* Marburg 168 wurde bereits 1997 sequenziert^[187-188] und lieferte die Ausgangsbasis für Sequenzvergleiche. Aufgrund des infunktionellen *sfp*-Gens (Genotyp: *trpC2 sfp*⁰), können keine NRPS-abhängigen Sekundärmetaboliten wie Bacillibactin oder Surfactin produziert werden. Die Tryptophan-Auxotrophie des Stamms kann als Selektionsmarker genutzt werden.

2.7.2 *Bacillus subtilis* ATCC 21332

Der Stamm *B. subtilis* ATCC 21332 diente als genetische Ausgangsbasis für die Klonierung aller hier beschriebenen Konstrukte und wurde für sämtliche *in vivo*-Arbeiten verwendet. Er ist prototroph für alle AS und besitzt ein funktionelles *sfp*-Gen, was die Assemblierung NRPS-abhängiger Sekundärmetaboliten erlaubt.

Die in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis*-Stämme bzw. Mutanten sind in Tab. 2-7 zusammengefasst.

Tabelle 2-7: In dieser Arbeit verwendete Stämme von *B. subtilis*.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Wildtyp (<i>sfp</i> ⁺)	[201]
<i>B. subtilis</i> BMM100	$\Delta dhbC::erm$	[191]
<i>B. subtilis</i> AA005	$\Delta dhbC::erm \Delta fpiA::kan$	diese Arbeit, [200]

2.7.3 *Escherichia coli* TOP10

Genotyp: *E. coli* F⁻ *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139*
 $\Delta(ara-leu)7697$ *galU* *galk* *rpsL* *endA1* *nupG*

Elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen (*Invitrogen*) wurden nach Ligationsexperimenten zur Plasmidpräparation eingesetzt.

2.7.4 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Genotyp: *E. coli* F⁻ *ompT* *hsdS_B*(*r_B*⁻ *m_B*⁻) *gal* *dcm* λ (DE3 [*lacI* *lacUV5*-T7 gene 1 *ind1* *sam7* *nin5*])

Der *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm (*Invitrogen*) wurde standardmäßig zur Genexpression verwendet. Er ist für Vektoren mit T7-Promotoren, wie die pET-Vektoren, geeignet, da er das chromosomale Gen für die T7-RNA-Polymerase enthält, welches unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors leicht mit IPTG induzierbar ist.^[202] Dieser Stamm enthält keine Gene, die für Lon- oder OmpT-Proteasen codieren, welche den Abbau rekombinanter Proteine durchführen würden.^[203]

2.8 Kulturmedien

Die im Folgenden aufgelisteten Medien wurden zur Fermentation und Kultivierung der oben angegebenen Mikroorganismen verwendet. Bei Festmedien wurde Agar zu einer Endkonzentration von 15 g L^{-1} zugegeben.

Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert und nicht autoklavierbare Komponenten (wie beispielsweise Glucose) sterilfiltriert.

2.8.1 LB-Medium

Als Standard-Medium für die Klonierungsarbeiten und Expressionsexperimente wurde LB-Medium (*lysogeny broth* bzw. Luria-Bertani) verwendet.

LB-Medium	
Komponente	Menge
Bacto®Trypton	10 g L^{-1}
Bacto®Yeast Extract	5 g L^{-1}
NaCl	10 g L^{-1}
NaOH-Lsg. ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$)	0.4 mL L^{-1}

2.8.2 Belitzky-Minimalmedium ohne Citrat

B. subtilis-Stämme wurden unter Eisenmangelbedingungen in BOC-MM angezogen.^[204] Dazu wurden zunächst die unten angegebenen Vorräte hergestellt, die anschließend im passenden Verhältnis mit $\text{bd. H}_2\text{O}$ verdünnt und autoklaviert wurden. Nach Abkühlen des Mediums wurden sterilfiltrierte Glucoselösung ($1 \text{ mL } 50\% \text{ (w/v) Glucose/100 mL Medium}$) und sterilfiltrierte Natriumglutamatlösung ($1 \text{ mL Na-Glu } (c = 0.45 \text{ mol L}^{-1})/100 \text{ mL Medium}$) zugesetzt. Alle Komponenten des Minimalmediums wurden in Polyethylen-Gefäßen angesetzt und auch in solchen gelagert.

20× BOC-Base, pH 7.5	
Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.3 mol L^{-1}
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.16 mol L^{-1}
KCl	0.54 mol L^{-1}
Tris-HCl	1.0 mol L^{-1}

25× BOC-Zusätze	
Komponente	Konzentration
KH_2PO_4	15 mmol L^{-1}
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	50 mmol L^{-1}
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.25 mmol L^{-1}

2.8.3 Difco-Sporulationsmedium

Difco-Sporulationsmedium (DSM) wurde ausschließlich als Festmedium eingesetzt und diente zur Sporulation von *B. subtilis*-Stämmen.^[205]

DSM	
Komponente	Menge
Nutrient Broth	8 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12 g L ⁻¹
KCl	1 g L ⁻¹
NaOH-Lsg. (c = 1 mol L ⁻¹)	0.6 mL L ⁻¹

2.8.4 *high salt*- und *low salt*-Medium

B. subtilis-Stämme wurden in *high salt* (HS)/*low salt* (LS)-Medium^[206-207] zur Entwicklung ihrer natürlichen Kompetenz und der anschließenden Transformation kultiviert.

10× S-Base	
Komponente	Menge
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	140 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	60 g L ⁻¹
Na ₃ -Citrat·3H ₂ O	10 g L ⁻¹
MgSO ₄ -Lsg. (c = 1 mol L ⁻¹)	1 mL L ⁻¹

Der Bestandteil 10× S-Base wurde autoklaviert.

HS-Medium	
Komponente	Volumen
10× S-Base	10 mL/100 mL
50% (w/v) Glucose	1 mL/100 mL
10% (w/v) Hefeextrakt	1 mL/100 mL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	1 mL/100 mL
8% (w/v) Arginin/0.4% (w/v) Histidin	10 mL/100 mL
0.5% (w/v) Tryptophan	1 mL/100 mL

HS-Medium wurde sterilfiltriert.

LS-Medium	
Komponente	Volumen
10× S-Base	2 mL
50% (w/v) Glucose	200 µL
10% (w/v) Hefeextrakt	200 µL
Spermin-Lsg. (c = 50 mmol L ⁻¹)	200 µL
2% (w/v) Caseinhydrolysat	100 µL
MgCl ₂ -Lsg. (c = 1 mol L ⁻¹)	2 mL/20 mL
bd. H ₂ O	17.25 mL

LS-Medium wurde immer frisch angesetzt und sterilfiltriert.

2.9 Puffer und Stammlösungen

Puffer für die Molekularbiologie

1× NEB-Puffer 1		1× NEB-Puffer 2	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Bis-Tris-Propan-HCl, pH 7.0	10 mmol L ⁻¹	NaCl	50 mmol L ⁻¹
MgCl ₂	10 mmol L ⁻¹	Tris-HCl, pH 7.9	10 mmol L ⁻¹
DTT	1 mmol L ⁻¹	MgCl ₂	10 mmol L ⁻¹
		DTT	1 mmol L ⁻¹

1× NEB-Puffer 3		1× NEB-Puffer 4	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
NaCl	100 mmol L ⁻¹	KOAc	50 mmol L ⁻¹
Tris-HCl, pH 7.9	50 mmol L ⁻¹	Tris-Acetat, pH 7.9	20 mmol L ⁻¹
MgCl ₂	10 mmol L ⁻¹	Mg(OAc) ₂	10 mmol L ⁻¹
DTT	1 mmol L ⁻¹	DTT	1 mmol L ⁻¹

1× T4 DNA Ligase-Reaktionspuffer		100× BSA	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 7.5	50 mmol L ⁻¹	BSA	10 mg L ⁻¹
MgCl ₂	10 mmol L ⁻¹	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7.0	20 mmol L ⁻¹
ATP	1 mmol L ⁻¹	NaCl	50 mmol L ⁻¹
DTT	10 mmol L ⁻¹	EDTA	0.1 mmol L ⁻¹
		Glycerin	5% (v/v)

Puffer für Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Reinigung

P1 (Resuspendierungspuffer)		P2 (Lysepuffer)	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 8.0	50 mmol L ⁻¹	NaOH	0.2 mol L ⁻¹
EDTA	10 mmol L ⁻¹	SDS	1% (w/v)
RNase A	100 µg mL ⁻¹		

P3 (Neutralisierungspuffer)		EB-Puffer (Elutionspuffer)	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
KOAc, pH 5.5	3.0 mol L ⁻¹	Tris-HCl, pH 8.5	10 mmol L ⁻¹

Für die Puffer PBI, QG, PE und N3 (alle *Qiagen*) sind keine Herstellerangaben verfügbar.

Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

10× TBE		6× DNA-Probenpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris	1 mol L ⁻¹	Xylenxanol FF	0.25% (w/v)
Borsäure	1 mol L ⁻¹	Ficoll Typ 400	15% (w/v)
EDTA	20 mmol L ⁻¹		

Puffer für die SDS-PAGE

Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris-HCl, pH 8.8	1.5 mol L ⁻¹	Tris-HCl, pH 6.8	0.5 mol L ⁻¹

10× SDS-PAGE-Laufpuffer		Probenpuffer	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Tris	0.25 mol L ⁻¹	Tris/HCl, pH 6.8	62.5 mmol L ⁻¹
Glycin	2 mol L ⁻¹	Glycerin	15% (v/v)
SDS	1% (w/v)	SDS	4% (w/v)
		Bromphenolblau	5 mg L ⁻¹
		2-Mercaptoethanol	4% (v/v)

Färbelösung		Entfärbelösung	
Komponente	Konzentration	Komponente	Konzentration
Coomassie Brilliant Blue G250	0.25% (w/v)	Essigsäure	5% (v/v)
Essigsäure	5% (v/v)	2-Propanol	28% (v/v)
Ethanol	50% (v/v)		

Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele (Volumina für 12 Gele)		
Komponente	Sammelgel 5%	Trenngel 12%
Bisacrylamid-/Acrylamidlösung	5.8 mL	32.0 mL
dest. H ₂ O	20.0 mL	18.8 mL
SDS (c = 10% (w/v))	350 µL	800 µL
Sammelgelpuffer	8.8 mL	–
Trenngelpuffer	–	20.0 mL
TEMED	35 µL	40 µL
APS (c = 10% (w/v))	175 µL	400 µL

Stammlösungen

Stammlösungen			
Ampicillin (in bd. H ₂ O)	100 mg mL ⁻¹	Kanamycin (in bd. H ₂ O)	35 mg mL ⁻¹
Chloramphenicol (in EtOH)	30 mg mL ⁻¹	Erythromycin (in EtOH)	1 mg mL ⁻¹
Lincomycin (in 50% (v/v) EtOH)	10 mg mL ⁻¹	IPTG (in bd. H ₂ O)	1 mol L ⁻¹

Siderophore

Siderophor-Stammlösungen			
Bacillibactin (in DMSO)	50 mmol L ⁻¹	Biotinyl-Petrobactin	50 mmol L ⁻¹
Enterobactin (in DMSO)	50 mmol L ⁻¹	mecam	50 mmol L ⁻¹
Petrobactin	50 mmol L ⁻¹	Vibriobactin	50 mmol L ⁻¹

Eisenfreie Siderophor-Stammlösungen wurden mit Konzentrationen von 50 mmol L⁻¹ angesetzt, die Beladung mit Eisen(III)-Ionen erfolgte mit gleichen Volumina einer FeCl₃-Lösung mit einer Konzentration von 50 mmol L⁻¹. Die so erhaltenen Stammlösungen der eisenbeladenen Siderophore wurden anschließend je nach Anwendung weiter verdünnt.

Enterobactin wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christopher T. Walsh, Harvard Medical School, Boston (MA), U.S.A. erhalten,^[71] Vibriobactin wurde von *EMC Microcollections* (Tübingen) bezogen, Petrobactin und Biotinyl-Petrobactin wurden von Nikolas Bugdahn synthetisiert,^[200] mecam wurde von Clemens Schwörer, Detlef Eppers und Markus Oberthür nach beschriebenen Protokollen synthetisiert.^[325-326]

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion und ortsgerichtete Mutagenese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) ermöglicht die exponentielle *in vitro*-Vervielfältigung beliebiger DNA-Sequenzen. Dabei werden die thermischen Eigenschaften der DNA unter Anwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase ausgenutzt, welche sich in sich wiederholenden Zyklen an DNA-Oligonukleotide anlagert und den gewünschten DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt.^[208-211]

Ortsgerichtete Mutagenese (engl: *site-directed mutagenesis*) wird zur Einführung von spezifischen Mutationen auf einem bereits vorhandenen Konstrukt durchgeführt. Die gewünschte Mutation wird durch die Primer eingeführt und mit entsprechend langen Reaktionszeiten wird das ganze Plasmid amplifiziert. Zur Entfernung der parentalen DNA, welche als Vorlage diente und die gewünschte Mutation nicht enthält, macht man sich die Methylierung von Plasmid-DNA zu Nutze. Plasmid-DNA die aus Zellen isoliert wurde, welche methylierungsaktiv sind, kann unter Verwendung der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut werden. Diese hydrolisiert spezifisch nur methylierte DNA, was auf die Amplifikate aus der PCR nicht zutrifft.

Zwei komplementäre Oligonukleotidprimer von etwa 40 Nukleotiden Länge, welche die gewünschte Mutation in ihrer Mitte oder am Ende enthielten, wurden eingesetzt um das Plasmid zu amplifizieren. Das Amplifikat wurde durch Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit gemäß den Herstellerangaben gereinigt, mit $2 \times 0.5 \mu\text{L}$ DpnI für $2 \times 2 \text{ h}$ verdaut und anschließend 2 h dialysiert. Das Dialysat wurde dann zur Elektrottransformation von *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Alle weiteren Schritte sind in Kapitel 3.1.4 beschrieben.

3.1.2 Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus *Bacillus subtilis* ATCC 21332 mit der folgenden Methode präpariert: Zunächst wurden 5 mL LB-Medium mit dem Bakterium inokuliert und die Kultur ÜN bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch 3 min Zentrifugation (13000 rpm , RT) pelletiert, in 1 mL bd. H_2O resuspendiert und erneut pelletiert. Das Pellet wurde in $500 \mu\text{L}$ Lysepuffer resuspendiert und das Reaktionsgefäß bis zu einer Füllhöhe von 1.25 mL mit säuregewaschenen Glasperlen aufgefüllt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 2 min vortexiert. Der Boden des Reaktionsgefäßes wurde mit einer heißen Kanüle durchstoßen und die wässrige Phase durch 3 s Zentrifugation in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde dann mit $275 \mu\text{L}$ NH_4OAc -Lösung (7 mol L^{-1} , pH 7.0) versetzt, zunächst 5 min bei 65°C und dann 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde nach Zugabe von $500 \mu\text{L}$ Chloroform vortexiert und 2 min zentrifugiert (13000 rpm , RT). Der Überstand wurde mit 1 mL 2-PrOH versetzt, 5 min bei RT inkubiert und das erhaltene Pellet mit $80\% \text{ (v/v)}$ EtOH gewaschen. Nach 2 min Zentrifugation (13000 rpm , RT) wurde das Pellet getrocknet, in $50 \mu\text{L}$ bd. H_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde entweder nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly^[212-213] oder unter zusätzlicher Ausnutzung der DNA-Bindung an Silicamatrizen mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) präpariert.^[214-215]

Dazu wurden zunächst 4 mL LB-Medium mit einer *Escherichia coli*-Einzelkolonie inokuliert und anschließend ÜN bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Daraufhin erfolgte die Pelletierung der ÜNK (13000 rpm, 3 min, RT) und die Resuspendierung des Pellets in 250 µL Puffer P1. Dann wurden 250 µL Puffer P2 zugegeben, die Reaktionsmischung durch Invertieren des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt und 5 min inkubiert, woraufhin 350 µL Puffer P3 zugegeben, die Reaktionsmischung 10 min auf Eis inkubiert und schließlich 30 min zentrifugiert wurde (13000 rpm, 30 min, 4 °C). Anschließend erfolgte die Behandlung des Überstandes mit 600 µL 2-PrOH, 1 h Zentrifugation (13000 rpm, RT), Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 500 µL 80% (v/v) EtOH. Nach 5 min Zentrifugation (13000 rpm, RT) wurde der Überstand verworfen, die Pellets ca. 6 min bei 37 °C getrocknet und anschließend in 30 µL Puffer EB aufgenommen.

Die Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) erfolgte nach den Herstellerangaben.

3.1.4 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die zur Konstruktion verwendeten Techniken waren größtenteils standardisiert und sind beschrieben.^[216] Die gewünschten Gene bzw. die entsprechenden Plasmide wurden mittels PCR unter Verwendung der Phusion™ HF DNA-Polymerase (*Finnzymes*) mit geringen Modifikationen der Herstellerangaben amplifiziert und die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit oder dem QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) gereinigt. Die gereinigten Amplifikate der Gene wurden mit Restriktionsendonukleasen gemäß den Herstellerangaben verdaut und mit den linearisierten Vektoren unter Verwendung von T4 DNA-Ligase (*New England Biolabs*) ligiert. Die amplifizierten Plasmide wurden nach Reinigung mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut und nach Reinigung und Dialyse der Transformation zugeführt. Reinigung der Verdauprodukte erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) gemäß den Herstellerangaben. Elektrokompetente *E. coli* TOP10-Zellen wurden mit den Ligationsprodukten bzw. verdauten Plasmiden transformiert, die Transformanten auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten selektiert und die Plasmide wie oben beschrieben präpariert. Verifizierung der erfolgreichen Klonierung erfolgte durch die Kartierung der Plasmide mit Restriktionsendonukleasen und DNA-Sequenzierung (*GATC Biotech*). Elektrokompetente *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen wurden anschließend mit den erhaltenen und verifizierten Plasmiden transformiert (siehe Tab. 2.6).

3.1.4.1 Konstruktion von *fpiA*–pET-28a(+)

Das Gen *fpiA* wurde aus genomischer DNA des Stamms *B. subtilis* ATCC 21332 unter Verwendung der in Tab. 2-5 angegebenen Oligonukleotidprimer amplifiziert und die nach Ligation entstandenen N- bzw. C-terminalen His₆-Fusions-Konstrukte durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung überprüft.

3.1.4.2 Konstruktion der *feuA*–pCB-28a(+)-Varianten

Das *feuA*-Gen aus dem Expressionsplasmid pOK01, welches von Oliver Klotz hergestellt wurde, wurde als Basis für die Konstruktion der Varianten K84A, K105A, R178A, R180A bzw. K213A genutzt. Dazu wurden die in Tab. 2-5 angegebenen Oligonukleotidprimer verwendet und die erhaltenen PCR-Produkte mit der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut. Bei den Konstrukten *feuA*-R178A und *feuA*-R180A wurde zunächst ein Restriktionsverdau zur Überprüfung der neu eingebauten Schnittstelle für HindIII durchgeführt, die Verifizierung der Punktmutationen erfolgte anschließend durch DNA-Sequenzierung.

3.1.5 Herstellung von Deletionsmutanten

Alle in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis*-Stämme sind in Tab. 2-7 aufgelistet. Einzelkolonien der *B. subtilis*-Stämme wurden auf LB- oder DSM-Agarmedium angezogen, die Selektion von positiven Doppelmутanten erfolgte mit den Antibiotika Kanamycin (10 µg mL⁻¹), Erythromycin (1 µg mL⁻¹) und Lincomycin (25 µg mL⁻¹) mit den angegebenen Konzentrationen. Für DNA-Manipulationen und Transformation von kompetenten Zellen wurde auf zuvor beschriebene Standardmethoden zurückgegriffen.^[207,216-217]

Der Stamm *B. subtilis* BMM100 ($\Delta dhbC::erm$),^[191] welcher aufgrund seines $\Delta dhbC$ -Phänotyps nicht in der Lage ist Bacillibactin oder seinen Vorläufer 2,3-DHB zu produzieren, wurde als Startpunkt verwendet, um Beeinflussung der späteren Wachstumsexperimente mit der Produktion und Wachstumsstimulation des endogenen Siderophors oder 2,3-DHB zu verhindern. Markerkassetten mit langen flankierenden Homologieregionen wurden durch PCR unter Verwendung von Phusion® DNA-Polymerase und den in Tab. 2-5 angegebenen Oligonukleotidprimern hergestellt (PCR-Synthese-Methode).^[218] Das Gen *fpiA* (*ylcQ*) wurde durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt, was die Mutantenselektion auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten erlaubte.

Dabei wurden die 1000 bp-DNA-Abschnitte stromauf- und stromabwärts des Ziellokus amplifiziert, wodurch ein überlappender Abschnitt einer *B. subtilis*-kompatiblen Kanamycin-Resistenzkassette eingeführt wurde. *B. subtilis* wurde anschließend unter Verwendung von HS-/LS-Medium mit dem entstandenen Fusionskonstrukt transformiert.^[206-207] Dazu wurde eine ÜNK von *B. subtilis* in HS-Medium angezogen und zur Inokulation von LS-Medium zu einer OD₆₀₀ von 0.05 genutzt. Nach Wachstum der Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 wurde sie zu 1 mL aliquotiert und zu jedem Aliquot 10-50 µg DNA zugegeben. Die Kultur wurde für 1 h weiter inkubiert und dann auf Antibiotika-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die korrekte Deletion von *fpiA* wurde durch PCR geprüft und bestätigt.

Die Erstellung der Deletionsmutante wurde von Alexander Albrecht (Arbeitsgruppe (AG) Prof. Dr. Marahiel, Fachbereich (FB) Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

3.1.6 Wachstumsexperimente

Einzelkolonien der *B. subtilis*-Stämme wurden auf LB- oder DSM-Agarmedium angezogen, die Selektion von positiven Doppelmutanten erfolgte mit den Antibiotika Kanamycin, Erythromycin und Lincomycin. Für Flüssigkulturexperimente wurden die Stämme in BOC-MM unter Verwendung von Glucose als Kohlenstoffquelle angezogen.^[204] Die Wachstumsbedingungen wurden durch die Zugabe von FeCl₃ oder verschiedenen Konzentrationen von *apo*-Siderophoren weiterhin variiert.

Die Einzelmutante *B. subtilis* BMM100 ($\Delta dhbC::erm$) und die Doppelmutante *B. subtilis* AA005 ($\Delta dhbC::erm \Delta fpiA::kan$) wurden ÜN in BOC-MM mit 0.5% (w/v) Glucose und 4.5 mmol L⁻¹ Natriumglutamat sowie mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert, unter Eisenmangel angezogen. 2 mL BOC-MM wurden mit den ÜNK zu einer Start-OD₆₀₀ von 0.001 inokuliert und in sterilen PE-Röhrchen mit 280 rpm bei 37 °C inkubiert. Nach 18 h Inkubation wurde die finale OD₆₀₀ gemessen. Die Kulturen wurden mit *apo*-BB, *apo*-PB oder FeCl₃ zu finalen Konzentrationen von 0 oder 10 µmol L⁻¹ supplementiert. Die Supplementationen wurden für jeden Stamm in drei parallelen Kulturen durchgeführt. Die Mittelwerte der finalen OD₆₀₀ die aus diesen parallelen Experimenten erhalten wurden, wurden zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen aufgetragen.

Die Wachstumsexperimente wurden teilweise zusammen mit Alexander Albrecht und Dr. Marcus Miethke durchgeführt (beide AG Prof. Marahiel, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg).

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Genexpression

Zur Expression der auf den Konstrukten codierten Gene dienten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. Es wurden 2 L- bzw. 5 L-Kulturkolben mit Schikanen mit 500 mL bzw. 1000 mL LB-Medium beschickt und mit einer ÜNK im Verhältnis 1:50 inokuliert. Das LB-Medium enthielt Kanamycin in einer Endkonzentration von 35 µg mL⁻¹. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 250 bzw. 160 rpm, bis eine OD₆₀₀ von 0.6 erreicht war. Dann wurde die Expression des Zielgens durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, *AppliChem*) zu einer Endkonzentration von 0.1-1.0 mmol L⁻¹ induziert und die Kultur für weitere 4 h bei den angegebenen Bedingungen inkubiert. Um für die Kristallisation nutzbare Proteinmengen zu produzieren wurden in der Regel Kulturen von 3 L verwendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8300·g, 20 min, 4 °C) geerntet, im für die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie verwendeten Puffer resuspendiert, in N₂(l) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Zellaufschluss

Zellaufschluss in präparativem Maßstab wurde mit Hilfe eines Fluidizers (EmulsiFlex-C5, Avestin) durchgeführt. Das Prinzip dieser Zellaufschlussmethode beruht auf großen Druckunterschieden, die das Gerät erzeugt. Zunächst lastet ein sehr hoher Druck auf der Zellsuspension, welcher beim Durchtritt durch ein kleines Ventil sehr schnell abfällt, wobei die auftretenden Scherkräfte die Zellen aufreißen.

Die Zellen wurden aufgetaut und zwei Durchläufen unter Eiskühlung bei einem Druck von 50000-100000 kPa aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch zweimalige Zentrifugation (38700-47800 g, 4 °C, 20-30 min) entfernt und das Zelllysate sterilfiltriert (Filtropur S 0.2, Sarstedt).

3.2.3 Chromatographische Verfahren

3.2.3.1 Ni²⁺-NTA-Metallionenaffinitätschromatographie

Die Ni²⁺-NTA-Chromatographie gehört zur Methodengruppe der IMAC (engl.: *immobilized metal ion affinity chromatography*). Bei der Einführung der Methode wurde Iminodiessigsäure als metallchelatisierende Gruppe verwendet,^[219] mittlerweile verwendet man Nitrilotriessigsäure (NTA, engl.: *nitrilotriacetic acid*),^[220] welche kovalent an eine entsprechende Matrix (beispielsweise Agarose) gebunden ist. NTA bildet mit Ni²⁺ chemisch stabile vierzählige Chelatkomplexe. Um die begünstigte oktaedrische Koordination mit Edelgaskonfiguration zu erreichen, werden die zwei fehlenden Koordinationsstellen des Ni²⁺ von AS-Seitenketten besetzt. Die Hexahistidinsequenzen rekombinanter Proteine besitzen für die Besetzung der Koordinationssphäre des Ni²⁺ eine besonders hohe Affinität und können daher zur chromatographischen Reinigung verwendet werden. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt in der Regel durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol.

Der Auftrag des Zelllysats auf die mit Ni²⁺-NTA Superflow-Material (*Qiagen*) beladene Säule erfolgte mit einer Flussrate von 0.5 mL min⁻¹, dann wurde die Säule mit dem Auftragspuffer A mit einer Flussrate von 1.0 mL min⁻¹ gewaschen, bis das A₂₈₀-Signal stabil blieb. Die Elution erfolgte dann mit Imidazol-haltigem Puffer B und einem linearen Gradienten von 0-100% innerhalb von 30 min mit einer Flussrate von 1.5 mL min⁻¹ (FeuA) bzw. 0-50% in 60 min und 50-100% in 15 min mit einer Flussrate von 1.0 mL min⁻¹ (FpiA). Die Protein-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht, die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten vereinigt und mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von etwa 1 mL konzentriert. Die verwendeten Puffer waren 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.0, 150 mmol L⁻¹ NaCl (FpiA) und 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 7.0, 100 mmol L⁻¹ NaCl (FeuA). Die Imidazolkonzentration in Puffer B betrug jeweils 200 mmol L⁻¹.

3.2.3.2 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration (auch Größenausschlusschromatographie oder SEC für engl.: *size exclusion chromatography*) beruht auf den unterschiedlich großen, den Proteinen zur Verfügung stehenden Volumina beim Durchlauf durch Poren einer Gelmatrix definierter Größe. Je nach Größe und Form des Proteins sind sie in der Lage in Poren bestimmter Größe zu diffundieren und dort zu verweilen. Proteine, die zu groß sind um in Poren einzudringen werden direkt, ohne Verzögerung durch Interaktion mit der Gelmatrix, eluiert.

Verwendet wurden die Säule HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (*GE Healthcare*). Die unter 20% (v/v) Ethanol gelagerte Säule wurden zunächst mit drei Säulenvolumina *bd.* H₂O gewaschen, mit drei Säulenvolumina Elutionspuffer äquilibriert und anschließend wurden 0.5-1.5 mL Proteinlösung aufgetragen. Die Flussrate betrug bei allen Schritten 2.5 mL min⁻¹, die verwendeten Puffer waren 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol L⁻¹ NaCl (FpiA) und 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 7.0, 150 mmol L⁻¹ NaCl (FeuA).

3.2.4 Ultrafiltration

Die Konzentrierung von Proteinlösungen wurde durch Ultrafiltration unter Verwendung von Amicon® Ultra-Konzentratoren (*Millipore*) mit einem Fassungsvermögen von 15 mL durchgeführt. Die Ausschlussgröße MWCO betrug 10 kDa. Konzentriert wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und maximal 3000·g. Die Zentrifugation wurde etwa alle 10 min unterbrochen und die Probe durch Auf- und Abpipettieren durchmischt, um einer Ausfällung des Proteins durch zu hohe lokale Konzentrationen an der Konzentratormembran vorzubeugen.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung verschiedener DNA-Fragmente nach ihrer Größe, sowohl in analytischem wie auch in präparativem Maßstab. Die Agarose bildet lose Maschen, durch die die DNA-Fragmente im elektrischen Feld wandern, wobei kleinere DNA-Fragmente die Agarosemaschen schneller durchlaufen können als größere Fragmente. Die Agarosekonzentration bestimmt die Größe der Maschen, d.h. über sie kann die Trennleistung des Gels festgelegt werden.

In eine Horizontalgelelektrophoresekammer wurde ein 1%-iges, mit geringen Mengen Ethidiumbromid versetztes, Agarosegel gegossen und nach Aushärtung mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6× DNA-Probenpuffer im Verhältnis ≤ 5:1 vermischt und in die Geltaschen gegeben. Für analytische Gele wurden bis zu 20 µL und für präparative Gele bis zu 70 µL Probe verwendet. Die Elektrophorese selbst erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Das Gel wurde anschließend unter einem UV-Schirm betrachtet und photographiert. Um Größe und Konzentration der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde auf eine Gelspur die 1 kb-, 100 bp oder 2-log-DNA-Leiter (*New England Biolabs*) als Referenz aufgetragen.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, nach Laemmli^[221]) wurde zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Proteinmenge und -reinheit nach Expressionen und Schritten der Proteinreinigung eingesetzt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend vor dem Auftragen auf das Gel 5 min auf Eis inkubiert. In der Regel wurden Gele mit einem 4%- und 12%-igen Polyacrylamidanteil in Sammel- bzw. Trenngel verwendet.

3.3.3 Peptidmassen-Fingerabdruck

Zur Identifizierung heterolog produzierter Proteine wurde die Bande des entsprechenden Proteins aus einem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und ein Verdau mit Trypsin durchgeführt. Die Protease Trypsin schneidet C-terminal jeweils nach Lysin und Arginin, sofern diesem nicht Prolin folgt. Die Gelbande wurde mit 200 µL Waschlösung (200 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃, 50% (v/v) MeCN) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Waschpuffer mittels Vakuumzentrifuge entfernt (30 min, 37 °C). Die Gelbande wurde dann mit 20 µL Trypsin-Lösung (0.02 mg mL⁻¹ Trypsin, 10% (w/v) NH₄HCO₃, 10% (v/v) MeCN, pH 8.1) versetzt und 45 min bei 37 °C inkubiert, woraufhin die überschüssige Trypsin-Lösung entfernt wurde und der Ansatz für weitere 16 h inkubiert wurde. Nach Zugabe von 25 µL Diffusionslösung (1% (v/v) TFA, 10% (v/v) MeCN, pH 8.1) konnten die erhaltenen Peptidfragmente durch 45 min Ultraschallbehandlung (RT) aus der Gelbande gelöst werden. Die nach dem tryptischen Verdau erhaltenen Fragmente, wurden durch Nano-HPLC-ESI-Massenspektrometrie getrennt und detektiert. Die erhaltenen Fragmente wurden durch die MASCOT-Software mit der MSDB-Datenbank verglichen und so eine qualitative Proteinbestimmung durchgeführt.^[222] Alle Schritte ab dem Trypsin-Verdau wurden von Dr. Uwe Linne und Natalia Fritzler (Abteilung Massenspektrometrie, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

3.3.4 ESI-Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen der Eisenkomplexe von PB und Biotinyl-PB wurden von Dr. Uwe Linne (Abteilung Massenspektrometrie, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Die verwendete Methode war ESI FT-ICR MS (engl.: *Electro Spray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*).^[223-224] Dabei wird zunächst die Probe durch die ESI-Methode ionisiert und anschließend mit einem Ionenfallenmassenspektrometer detektiert.

3.3.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Matrix-gestützte LASER Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl.: *matrix assisted LASER desorption/ionization mass spectrometry; time of flight*) wurde zur Analyse einzelner HPLC-Fractionen der Bacillibactin-Reinigung eingesetzt. Auf dem Probenträger wurden je 1 µL Probe und Matrix (2,5-DHB) gemischt und cokristallisiert. Die Analyse der Cokristalle erfolgte mit einem Biflex III-System (Bruker). Die Methode ist besonders schonend, da die vom LASER emittierte Energie zunächst auf die Matrixmoleküle übertragen wird, welche dann in der Folge die Probenmoleküle ionisieren.

3.4 Spektroskopische Methoden

3.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

3.4.1.1 Colorimetrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford^[225] geht von der Interaktion des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 mit kationischen AS-Resten eines Proteins aus. Nach der Reaktion des Farbstoffes verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm, einhergehend mit einer großen Verstärkung der Extinktion. Die Kalibration erfolgte mit BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 0-20 mg mL⁻¹. Die Bradford-Lösung (*Bio-Rad*) wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser versetzt, filtriert und lichtgeschützt bei RT in einem Glasgefäß aufbewahrt. Zur Messung wurde 1 mL der verdünnten Bradford-Lösung mit 1-10 µL Proteinlösung versetzt, 5 min inkubiert und schließlich die Absorption bei 595 nm gegen die einer Referenzprobe gemessen. Alle Messungen erfolgten als Dreifachbestimmungen.

3.4.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die zur Proteinkonzentrationsbestimmung genutzte, bei 280 nm zu beobachtende Absorption eines Proteins, ist hauptsächlich durch die der aromatischen AS Tyrosin und Tryptophan, nicht jedoch Phenylalanin, bedingt. Hochgeordnete Strukturen innerhalb des Proteins können die molaren Absorptionskoeffizienten von Tyr und Trp beeinflussen, daher ist die photometrische Konzentrationsbestimmung sehr störanfällig. Eine grobe Bestimmung der Proteinkonzentration kann mit Gl. (3-1) erreicht werden:^[226]

$$c = (1.55 \cdot A_{280}) - (0.76 \cdot A_{260}) \quad \text{Gl. (3-1)}$$

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. (3-2)}$$

$$E = \varepsilon \cdot \frac{m}{V \cdot M} \cdot d = \varepsilon \cdot c_m \cdot \frac{d}{M} \quad \text{Gl. (3-3)}$$

$$c_m = \frac{E \cdot M}{\varepsilon \cdot d} \quad \text{Gl. (3-4)}$$

c : Stoffmengenkonzentration in mg mL⁻¹. A_x : Absorption bei x nm. E : Extinktion. ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient. V : Volumen. d : Schichtdicke. n : Stoffmenge $n = \frac{m}{M}$. m : Masse. M : molare Masse. c_m : Massenkonzentration.

Die Extinktionskoeffizienten von Proteinen sind von ihrer Primärstruktur abhängig und lassen sich daher berechnen, so dass man sie zur Konzentrationsbestimmung nutzen kann.^[227] Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 3-2) und den entsprechenden Umstellungen (Gl. (3.3-3.4)).

Für photometrische Konzentrationsbestimmungen wurde ausschließlich der Nanodrop™ 1000 verwendet.

3.4.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie beruht auf der Messung des circularen Dichroismus, d.h. der Messung des Unterschiedes zwischen der Drehung von links- und rechtscircular polarisiertem Licht beim Durchgang durch eine Probe. Wenn Chromophore (dies sind bei Proteinen im Wesentlichen die Peptidbindungen des Rückgrats und die Reste der aromatischen Seitenketten) in asymmetrischer Umgebung mit polarisiertem Licht wechselwirken, tritt ein solcher circularer Dichroismus auf. Die asymmetrische Umgebung ist bei Proteinen durch ihre chiralen AS in jedem Fall gegeben. Sekundärstruktur motive wie α -Helices und β -Faltblätter enthalten die Chromophore des Rückgrats in regelmäßiger räumlicher Anordnung und weisen daher charakteristische CD-Spektren auf.^[228-229]

Da die Absorption von links- bzw. rechtscircular polarisiertem Licht und damit die Extinktionskoeffizienten der optisch aktiven Moleküle ungleich sind ($\varepsilon_l \neq \varepsilon_r$), ist das austretende Licht elliptisch polarisiert (Phasenverschiebung und unterschiedliche Länge der Summenvektoren der elektrischen Feldkomponenten). Umrechnungsbeziehungen ausgehend von der Messgröße (gemessene Elliptizität Θ) sind in den Gl. (3-5)-Gl. (3-8) angegeben.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r = \frac{A_l - A_r}{c \cdot l} \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \quad \text{Gl. (3-5)}$$

$$[\Theta] = 3300 \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{Gl. (3-6)}$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot 10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad \text{Gl. (3-7)}$$

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}} \cdot 10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad \text{Gl. (3-8)}$$

$\Delta\varepsilon$: differentieller molarer circulardichroitischer Extinktionskoeffizient in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. ε_l , ε_r : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von links- bzw. rechts-circular polarisiertem Licht in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Θ : gemessene Elliptizität in mdeg. $[\Theta]$ molare Elliptizität. $[\Theta]_{\text{MRW}}$: mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ (MRW für engl.: mean residue weight). c : Konzentration in mol L^{-1} . d : Schichtdicke in cm. N_{AS} : Anzahl der Aminosäurereste des Proteins.

Alle Spektren wurden mit einem J-810 Spectropolarimeter (*Jasco*) aufgenommen. Für die einzelnen Messkurven wurden folgende Parameter verwendet. Die Messtemperatur betrug 22.5°C und die Bandbreite 1 nm , die Scangeschwindigkeit $100/50/50/50 \text{ nm min}^{-1}$, die Auflösung $0.5/0.2/0.2/0.2 \text{ s}$, die Dämpfung $1/1/1/2 \text{ s}$ und die Zahl der akkumulierten Spektren $3/10/5/5$. Die Zahlen beziehen sich auf die Liganden $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ / $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ / $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ / $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$. Die Konzentration der (Protein)–Ligand-Komplexe betrug $830 \mu\text{mol L}^{-1}$, gemessen wurde in leicht gepuffertem Wasser (5 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7.0, 25 mmol L^{-1} NaCl / 5 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer, pH 7.0 / 5 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8.0, 25 mmol L^{-1} NaCl / 5 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 8.0, 25 mmol L^{-1} NaCl).

Schmelzkurven wurden in Küvetten mit 0.5 cm oder 1 cm Schichtdicke bei einer konstanten Wellenlänge von 222 nm mit einer Bandbreite von 1 nm , einer Dämpfung von 1 s und einer Auflösung von 0.2°C aufgenommen. Der beobachtete Temperaturbereich betrug $5\text{-}95^\circ\text{C}$ und die Temperatursteigerung 1°C min^{-1} . Die Messbedingungen für aufgenommene Abkühlungskurven waren die gleichen: Bei Erreichen von 95°C wurde die Probe 1 min bei dieser Temperatur gehalten

und dann mit der zuvor benannten Rate von $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ abgekühlt. Die Konzentration von FpiA betrug $2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ in 2.5 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0, 12.5 mmol L^{-1} NaCl. Die Konzentration von FeuA und seinen Varianten bei Zugabe von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ betrug $5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ in 10 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7.0 und bei den Messungen der De- und Renaturierungskurven in Gegenwart von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ $2.5\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ in 5 mmol L^{-1} Na-Phosphatpuffer pH 7.0.

Alle Schritte vor der Messung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$ wurden unter Rotlicht (629 nm) durchgeführt.

3.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz entsteht nach Anregung eines elektronischen Übergangs in ein höheres Energieniveau. Der Übergang erfolgt in der Regel vom Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes und unterliegt keinen Auswahlregeln. Daher erfolgt nach der quantenmechanischen Interpretation des Franck-Condon-Prinzips der Übergang in den Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustands dessen Wellenfunktion das größte Überlappungsintegral mit der des Schwingungsgrundzustands des elektronischen Grundzustandes aufweist. Fluoreszenz wird jedoch nur aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands beobachtet, da die Schwingungsanregung wesentlich schneller in den Grundzustand zurückkehrt, zum Beispiel durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen oder der Gefäßwand. Fluoreszenz zeigt daher eine Rotverschiebung gegenüber dem anregenden Licht („Stokes-Shift“).

Intrinsische Fluoreszenzspektroskopie wurde genutzt um die Dissoziationskonstanten von Proteinen und ihren (potentiellen) Substraten zu bestimmen. Sie beruht auf der Löschung (engl.: *quenching*) der durch die aromatischen AS Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bedingten Eigenfluoreszenz der Proteine bei Komplexbildung mit dem Liganden, da die Anregungsenergie durch Stoßreaktionen an den Liganden übertragen werden kann, was eine strahlungslose Desaktivierung ermöglicht.

Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten wird die auf dem Massenwirkungsgesetz basierende Gl. (3-9) genutzt. Wenn der Ligand wie im vorliegenden Fall keine Eigenfluoreszenz bei den gewählten Messbedingungen zeigt ($f_L = 0$), vereinfacht sich die Gleichung zu Gl. (3-10). Wenn keine hochaffine Bindung beobachtet wurde, erfolgte zusätzlich eine Auswertung mittels Gl. (3-11), die ein einfaches Ein-Ort-Bindungsmodell zu Grunde legt und Dissoziationskonstanten in derselben Größenordnung wie Gl. (3-11) erbrachte. Die Messdaten wurden vor der Auswertung um die geringfügige Eigenfluoreszenz des Puffers korrigiert.

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \cdot \frac{f_P}{2} + ([L]_t - [P]_t - K_D) \cdot \frac{f_L}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \cdot \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \cdot \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad \text{Gl. (3-9)}$$

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \cdot \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \cdot \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \cdot \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t \cdot [L]_t} \quad \text{Gl. (3-10)}$$

F : Fluoreszenz. $[P]_t$, $[L]_t$: totale Konzentrationen von Protein bzw. Ligand. K_D : Dissoziationskonstante. f_P , f_L , f_{PL} : relative molare Fluoreszenzkoeffizienten des freien Proteins, des freien Liganden bzw. des Protein-Ligand-Komplexes. K_D und f_{PL} wurden in den Berechnungen als freie Parameter definiert und f_P wurde auf $100\% \mu\text{M}^{-1}$ entsprechend dem Startwert gesetzt.

$$F = F_{\max} \cdot \frac{[L]_t}{(K_D + [L]_t)} \quad \text{Gl. (3-11)}$$

F : Fluoreszenz. F_{\max} : maximale Fluoreszenz. $[L]_t$: totale Konzentration des Liganden. K_D : Dissoziationskonstante.

Für alle Messungen wurde ein FP-6500 Spectrofluorometer (*Jasco*) genutzt. Die Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 22.5°C bei Nutzung einer Anregungs- und Emissionsbandbreite von je 10 nm für FpiA und je 5 nm für FeuA durchgeführt. Der Messbereich erstreckte sich von 300 bzw. 295-400 nm (für FpiA bzw. FeuA) mit einer Auflösung von 0.5 nm und einer Dämpfung von 0.5 s. Die Anregungs- bzw. Emissionsmaxima wurden für FpiA zu 280 nm und 331 nm sowie bereits zuvor für FeuA zu 280 nm und 329 nm bestimmt.^[191] Die für die Messungen verwendeten Proteinkonzentrationen betrugen 250 nmol L^{-1} für FpiA und $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ für FeuA. Die Proben wurden vor der Messung zusammengegeben und für 1 h bei der Messtemperatur äquilibriert um einen stabilen Zustand sicherzustellen. Alle Schritte vor der Messung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$ wurden unter striktem Lichtausschluss durchgeführt.

3.4.4 *in crystallo*-Absorptionsspektroskopie

Die *in crystallo*-Absorptionsspektroskopie hat in den letzten Jahren verstärkte Aufmerksamkeit erlangt. Mit ihr ist es möglich die spektroskopischen Eigenschaften eines Proteins, eines Cofaktors oder eines Protein-Ligand-Komplexes im Kristall zu beobachten. Neuere Entwicklungen ermöglichen auch die Beobachtung von Veränderungen während der Illumination mit Synchrotronröntgenstrahlung.

in crystallo-Absorptionsspektren wurden im ID29S-Cryobench-Labor der ESRF^[230] an einem HR2000 Mikrospektrophotometer (*Ocean Optics*) bei einer Temperatur von 100 K aufgenommen. Darüber hinaus wurden Spektren an einem Online-Mikrospektrophotometer während der Datensammlung an der ESRF-Beamline ID14-1 aufgenommen.^[231]

3.5 Proteinkristallisation

Gut streuende Kristalle stellen die Grundvoraussetzung zur Proteinstrukturbestimmung mittels röntgenographischer Methoden dar. Computergestützte Vorhersagen der optimalen Kristallisationsbedingung sind bisher nicht ausgereift, weswegen eine empirische Bestimmung notwendig ist. Dabei können neben der Proteinkonzentration zahlreiche weitere Faktoren variiert

werden: Temperatur, pH-Wert, Art des Puffers sowie Konzentration und Art des Fällungsmittels (Präzipitans).

Die Kristallisation beruht dabei auf einer allmählichen Erhöhung der Konzentration von Protein und/oder Präzipitans, wodurch eine übersättigte Proteinlösung (sog. Mutterlauge) entsteht, aus der sich das Protein in kristalliner Form abscheidet (Abb. 3-1).

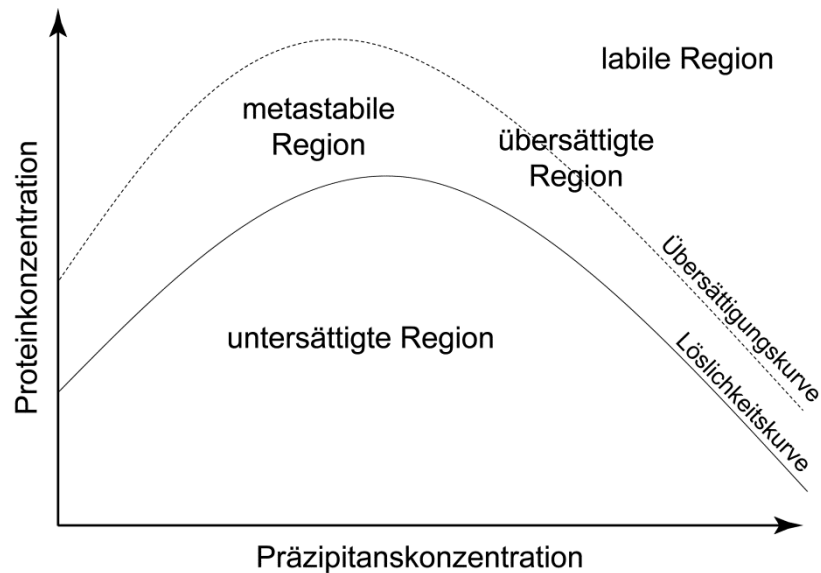


Abbildung 3-1: Allgemeines Phasendiagramm der Proteinkristallisation.

In der labilen Region entstehen und wachsen Kristallisationskeime spontan. In der metastabilen Region wachsen stabile Kristallisationskeime, es entstehen jedoch keine neuen. Der Verlauf des Phasendiagramms muss für jedes Protein empirisch etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Dampfphasendiffusion im *sitting drop*- und *hanging drop*-Verfahren als die heute gängigste Methode angewendet. Dabei stehen sich in einem luftdicht verschlossenen System ein Tropfen aus Protein und Kristallisationslösung und ein deutlich größeres Volumen der Kristallisationslösung gegenüber. Die Präzipitanskonzentration im Tropfen ist durch Vermischung mit der

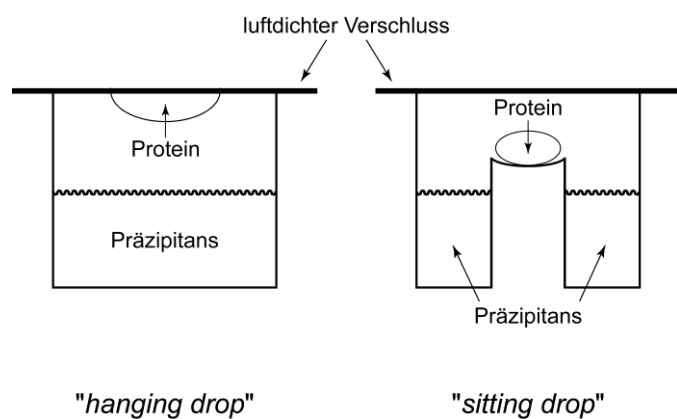


Abbildung 3-2: „hanging drop“- und „sitting drop“-Kristallisationsmethoden.

Proteinlösung geringer als die des Reservoirs, daher findet durch Verdampfen von Wasser und Dampfdiffusion allmählich ein Konzentrationsausgleich zwischen dem Tropfen und der annähernd konstanten Konzentration des Reservoirs statt. Die Proteinkonzentration wird bei diesem Prozess bis zum Erreichen des Äquilibriums sukzessive erhöht, was eine Übersättigung der Lösung bezüglich ihrer Proteinkonzentration zur Folge haben kann. Dies führt im Idealfall zur Bildung weniger

Nukleationskeime und zum Wachstum von Einkristallen. Man spricht je nach Position des Kristallisationstropfens vom „sitzenden“ oder „hängenden“ Tropfen (engl.: *sitting drop/hanging drop*, siehe Abb. 3-2).

Die Protein- und Kristallisationslösungen wurden vor der Kristallisation mit UltraFree-MC Sterilfiltereinheiten partikelfrei filtriert um die unerwünschte Aggregation von Protein oder Präzipitans zu verhindern.

3.5.1 Automatisiertes Kristallisationsscreening

Um erste Hinweise auf geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden werden heutzutage in der Regel *sparse matrix*-Screens^[232] eingesetzt, d.h. Screens die keine systematische Variation der Komponenten enthalten und deren Bedingungen überdurchschnittlich häufig zu erfolgreicher Proteinkristallisation führten.

Hierfür wurden vorgefertigte Kristallisationslösungen der Firma *Qiagen* verwendet, die mit dem Kristallisationsroboter Cartesian Microsys™ SQ4000 (*Genomic Solutions*) in Kristallisationsplatten (96 well Innovaplate™ SD-2 (*Innovadyne*)) pipettiert wurden. Diese besitzen 96 Reservoirs für verschiedene Kristallisationsbedingungen (8×12-Format) und weisen pro Reservoir zwei Vertiefungen für die *sitting drop*-Kristallisation auf.

Zunächst wurden 80 µL der Kristallisationslösung per Hand in die Reservoirs pipettiert und der Tropfen aus Protein und Kristallisationslösung mit einem Gesamtvolumen von 600-1000 nL vom Roboter zusammenpipettiert. Die Kristallisationsplatten wurden mit einer speziellen Folie (VIEWseal™ Klebefolien, *Greiner Bio-One*) luftdicht verschlossen und anschließend in Inkubationsschränken bei einer konstanten Temperatur von 18 °C inkubiert. Die Platten wurden in der Regel zwei bis drei Tage nach Fertigstellung erstmals unter einem Stereomikroskop kontrolliert, danach im Abstand von einer Woche. Ausgehend von den Ergebnissen des Screenings wurde die Optimierung der Kristallisationsbedingungen verfolgt.

3.5.2 Kristallisationsoptimierung

Kristalle, die aus ersten Screenings erhalten werden sind oftmals für Röntgenbeugungsexperimente noch ungeeignet, sei es aufgrund ihrer Größe oder ihres Streuvermögens. Zur Optimierung der Kristallisation werden die physikochemischen Parameter die zur Kristallbildung beitragen ausgehend von einer Startbedingung in systematischer Weise variiert. Die Optimierung wurde in dieser Arbeit meist im *sitting drop*-Verfahren unter Verwendung des Kristallisationsroboters Cartesian Microsys™ SQ4000 (*Genomic Solutions*) und somit unter denselben Bedingungen wie bereits für das erste Screening durchgeführt. Für Optimierungen oder Reproduktionen die von Hand durchgeführt wurden, wurden wiederverschließbare EasyXtal Tools (*Qiagen*) im 4×6-Format verwendet. Typischerweise wurden hierbei 1 bzw. 2 µL Proteinlösung mit 1 bzw. 2 µL Kristallisationslösung auf dem Schraubverschluss vermischt und der Schraubverschluss auf das mit 900 µL Kristallisationslösung befüllte Reservoir aufgeschraubt und bei 18 °C inkubiert.

3.5.3 Cokristallisation und *soaking*-Experimente

Während es rekombinante Methoden ermöglichen Proteine in großer Menge herzustellen ist ihre Beladung mit Cofaktoren u.ä. selten gegeben, da diese nicht zwangsläufig kovalent gebunden sind und der Expressionswirt die benötigten Verbindungen nicht oder nur in nicht ausreichender Menge zur Verfügung stellen kann. Weiterhin sind Strukturinformationen von Enzymen und Transportproteinen mit ihren jeweiligen Substraten, Substratanaloga, Inhibitoren und Cofaktoren von besonderem Interesse. Dazu können die jeweiligen Substanzen vor der Kristallisation hinzugefügt werden (Cokristallisation) oder nachträglich in bereits vorhandene Kristalle inkorporiert werden (engl.: *soaking*, „vollsaugen“).

3.5.3.1 Cokristallisation

Bei nachträglicher Zugabe von Molekülen zu Proteinkristallen können sich durch die Wechselwirkung von Protein und Ligand teilweise beträchtliche Veränderungen im Kristallgitter ergeben. Dadurch kann der Kristall erheblich an Qualität und Eignung für die Strukturbestimmung einbüßen und sich im schlimmsten Fall auflösen. Daher werden Liganden häufig vor dem Kristallisationsprozess zur Kristallisationslösung zugegeben, teilweise bereits während der Proteinreinigung. Gute Voraussetzungen für Cokristallisation sind eine starke Bindung des Liganden durch das Protein und/oder ein hoher Überschuss des Liganden. Geeignete Kristallisationsbedingungen für *apo*-Proteine müssen sich nicht zwangsläufig auf die ligandgebundene Form übertragen lassen, daher ist ein neues Screening sinnvoll.

3.5.3.2 *soaking*-Experimente

soaking-Experimente erlauben die nachträgliche Inkorporation von Kleinmolekülen in Proteinkristalle, welche im Gegensatz zu Kleinmolekülkristallen einen hohen Wassergehalt von oft über 50% aufweisen. Die korrespondierenden größeren Abstände im Kristallgitter und die oft vorhandenen solvensgefüllten Kanäle können zur Einführung eines Liganden in den Kristall genutzt werden. Dazu wird entweder der Ligand direkt in die Kristallisationslösung gegeben oder der Kristall wird in einen neuen Tropfen mit hoher Ligandkonzentration überführt. Die Zeitdauer für ein solches Experiment richtet sich vornehmlich nach der Stabilität des Kristalls und kann zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden betragen.

3.6 Proteinstrukturbestimmung

3.6.1 Testen von Cryobedingungen

Datensammlung an Proteinkristallen erfolgt heutzutage fast ausschließlich unter sog. Cryobedingungen, d.h. unter permanenter Kühlung durch einen Kaltstickstoffstrom (100 K). Dies gewährleistet eine erheblich reduzierte Strahlungsschädigung des Kristalls und die damit einhergehenden Qualitätseinbußen der Messung, verglichen mit Messungen bei RT. Da Proteinkristalle für Röntgenbeugungsexperimente aus wässriger Lösung entnommen werden, ist die vorherige Überführung in eine sog. Gefrierschutzlösung („Crypuffer“) nötig, um der Ausbildung von Eis und damit der Entstehung charakteristischer sog. „Eisringe“ (1.9 Å, 2.5 Å, 3.66 Å) auf dem Beugungsbild vorzubeugen. Als Cryopuffer wird in der Regel die Mutterlauge mit einem die Ausbildung geordneter Wasserkristalle verhindernden Reagenz, wie Glycerin oder niedermolekularem PEG, verwendet. Zum Eignungstest wurde eine Nylonschleife mit dem Cryopuffer benetzt, im Kaltstickstoffstrom schockgefroren und anschließend 2× 10 min an der Röntgendrehanode belichtet. Die Inspektion des Beugungsbildes gab dann Auskunft über die Eignung des Cryopuffers.

3.6.2 Datensammlung und Datenreduktion

Erste Datensätze der erhaltenen Kristalle wurden am hauseigenen Röntgendiffraktometer aufgenommen. Die Nylonschleife wurde auf einem Goniometerkopf positioniert und der Kristall im Strahlengang der Röntgenquelle zentriert. Die Belichtungszeit betrug dabei 20 min, der Drehwinkel $\Delta\phi$ während der Belichtung lag bei 0.3°. Die optimalen Datensammelparameter wurden mit dem Programm iMosflm^[233] ermittelt. Hochauflösende Datensätze wurden an den Beamlines ID14-1, ID14-2, ID14-4, ID23-1, ID23-2 oder ID29 der ESRF aufgenommen, in diesem Fall erfolgte die Festlegung der optimalen Datensammelstrategie mit dem dort installierten Programm DNA. Die Datensammlung erfolgte jeweils im Kaltstickstoffstrom (100 K).

Die Integration der Daten wurde in der Regel mit dem Programm XDS vorgenommen,^[234] im Falle der nativen Kristallform II mit dem Programm iMosflm^[233], die Skalierung der Datensätze erfolgte mit XSCALE. Zur Analyse der Skalierung wurde das Programm SCALA aus dem CCP4-Paket verwendet.^[235]

3.6.3 Strukturlösung und Modellbau durch molekularen Ersatz

Die Grundlage eines zu bauenden Strukturmodells ist stets die vorherige Berechnung der Elektronendichte, wozu die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ und die zugehörige Phase α notwendig sind. Die Strukturfaktoramplituden $|F_{hkl}|$ sind proportional zur gemessenen Intensität und damit experimentell zugänglich, während dies für die Phase α nicht gilt. Das zentrale Problem in der Kristallographie stellt daher die Bestimmung des Phasenwinkels α für die einzelnen Strukturfaktoramplituden dar und wird daher auch als „Phasenproblem“ bezeichnet.

Zur Phasenbestimmung kam in dieser Arbeit ausschließlich die Methode des molekularen Ersatzes (engl.: *molecular replacement*) zum Einsatz. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Faltung eines

Proteins oftmals wesentlich stärker konserviert ist als seine Aminosäuresequenz und man davon ausgeht, dass es nur eine begrenzte Anzahl einzigartiger Faltungstypen gibt.^[236] Proteine mit einer Sequenzidentität von nur 30% besitzen oftmals bereits eine vergleichbare Tertiärstruktur.^[237] Zur Nutzung dieser Methode sind daher eine oder mehrere bereits bekannte Proteinstrukturen („Suchmodell“) nötig, deren Sequenzen möglichst hohe Identitäten zum Zielprotein aufweisen. Das Suchmodell wird in der Einheitszelle platziert und ist dabei durch drei Rotations- und drei Translationsparameter bestimmt. Zur Minimierung der benötigten Rechenleistung werden nacheinander zunächst die Rotations- und dann die Translationssuche durchgeführt. Der Vergleich der Patterson-Funktionen von Suchmodell und zu lösendem Datensatz erlaubt dann die Bewertung der Suchmodellorientierungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm Phaser aus dem CCP4-Paket verwendet.^[235,238] Für die Lösung der *apo*-FeuA-Struktur wurde eine niedriger aufgelöste Kristallstruktur desselben Proteins genutzt, die bereits in der Proteindatenbank deponiert war (PDB-Code: 2PHZ). Die Lösung des FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Komplexes erfolgte mit der eigenen *apo*-Struktur, die der FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻- und FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻-Komplexe mit der des FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Komplexes als Suchmodell (PDB-Code: 2WHY).

3.6.4 Strukturverfeinerung

Nachdem die anfänglichen Strukturmodelle durch das Programm Phaser erhalten wurden,^[235,238] wurden die Atomkoordinaten und B-Faktoren mit den Programmen Coot^[239-240] und Refmac5^[241] weiter verfeinert. Beim Verfeinerungsprozess macht man neben den experimentellen Daten Gebrauch von stereochemischen Parametern denen Proteine unterliegen, wie z.B. Bindungslängen, Torsionswinkel oder die Häufigkeit bestimmter Seitenkettenrotamere.

Nach Verfeinerung des Proteinrückgrats und der Aminosäureseitenketten, wurden durch Nutzung der $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ - und $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ -Elektronendichtekarten anschließend die Substrate sowie Wassermoleküle und Ionen in das Modell eingebaut. Das jeweilige Strukturmodell lässt sich anhand statistischer Parameter bewerten. Darunter sind der kristallographische R-Faktor (auch „Arbeits-R-Faktor“, R_{work}) und der freie R-Faktor (R_{free}). Der kristallographische R-Faktor liefert ein Maß für die Übereinstimmung zwischen den beobachteten Daten (F_{obs}) und dem berechneten Strukturmodell (F_{calc}) und sollte bei gut verfeinerten Strukturen (abhängig von der Auflösung) kleiner als 20% sein. Für den freien R-Faktor wird ein sog. Testdatensatz von etwa 1000 Reflexen definiert, der nicht in die Verfeinerung einbezogen wird. Seine Berechnung erfolgt analog zum kristallographischen R-Faktor. Der freie R-Faktor ist ein unabhängiges Maß für die Qualität des Modells, da im Gegensatz zum kristallographischen R-Faktor nicht gegen seine Daten verfeinert wurde. Daher stellt der freie R-Faktor ein Maß für die „Voreingenommenheit“ des Modells dar.^[242-243]

Der Unterschied zwischen kristallographischem und freiem R-Faktor sollte zwischen 2% und 7% liegen. Ist der Unterschied größer, deutet dies auf eine Überinterpretation der Daten hin (engl.: *overfitting*), d.h. dass das Maß an Detailreichtum im Strukturmodell nicht durch die experimentellen Daten gedeckt ist.^[242-244]

3.6.5 Bioinformatische Charakterisierung von Sequenzen und Strukturmodellen

Die bioinformatische Auswertung eines aus einem Röntgenbeugungsexperiment erhaltenen Strukturmodells stellt einen wichtigen Schritt in der Analyse der erhaltenen Daten dar. Neben den bereits vorgestellten kristallographischen Programmen zur Bearbeitung der Rohdaten, Strukturlösung und Strukturverfeinerung wurden eine Reihe weiterer, teilweise Server-basierter Programme zur Analyse des Strukturmodells und auch der Aminosäuresequenz des Proteins eingesetzt.

ALINE

Bei ALINE handelt es sich um einen „*what you see is what you get*“-Editor zur graphischen Darstellung von Sequenzvergleichen. Neben deren einfacher Erstellung ist ausserdem die graphische Übertragung des Grads an Sequenzkonservierung auf ein Strukturmodell möglich.^[245]

APBS

APBS (engl.: *Adaptive Poisson Boltzmann Server*) ist ein Programm, welches die elektrostatischen Eigenschaften eines Biomoleküls mittels der Poisson-Boltzmann-Gleichung berechnet.^[246] Es wurde in dieser Arbeit in Form eines Plugins für PyMOL verwendet, mit dem alle elektrostatischen Oberflächenpotentiale dargestellt wurden.

BLAST

Proteine mit Sequenzhomologien wurden mit dem BLAST-Server (engl.: *Basic Local Alignment Search Tool*) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelt. Beim Vergleich wird die statistische Signifikanz von identischen oder ähnlichen AS bewertet, was auf mögliche funktionelle oder evolutionäre Verwandtschaftsbeziehungen hinweisen kann.^[247-248]

Website: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

CCP4

Das CCP4-Paket (engl.: *Collaborative Computational Project No. 4*) stellt eine Sammlung von Programmen für strukturbiochemische Fragestellungen dar. Viele bereits zuvor genannte Programme sind Teil des CCP4-Pakets.^[235]

DALI

Der DALI-Server dient dem Vergleich von dreidimensionalen Strukturmodellen mit in der PDB deponierten Strukturen.^[249-250]

DISOPRED2

Der DISOPRED2-Server wurde zur Voraussage von ungeordneten Regionen eines Proteins genutzt.^[251-252] Die Voraussage konnte durch die spätere kristallographische Analyse bestätigt werden.

Website: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>

HIC-Up

Bei der HIC-Up-Datenbank (*Hetero-compound Information Centre – Uppsala*) handelt es sich um eine Sammlung von Strukturinformationen von Kleinmolekülverbindungen die in der Proteindatenbank mit hinterlegt sind.^[253-255]

Website: <http://xray.bmc.uu.se/hicup/>

LipoP

Der LipoP 1.0-Server wurde genutzt um automatisch Lipoproteine und die genauen Lipidierungspositionen vorauszusagen.^[256] Diese Voraussagen wurden in Klonierungsarbeiten dann entsprechend berücksichtigt. Auch wenn der LipoP 1.0-Server nur auf die Sequenzen Gram-negativer Organismen trainiert wurde, hat er sich dennoch auch als geeignet für Gram-positive Bakterien herausgestellt.^[257]

Website: <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>

PROCHECK

PROCHECK wurde verwendet, um die Qualität der stereochemischen Parameter des erhaltenen Strukturmodells zu überprüfen und mit bekannten Parametern zu vergleichen. Es ist Teil des CCP4-Pakets.^[258]

ProDrg

Der ProDrg2.5 (beta)-Server generiert automatisch Koordinaten und molekulare Topologien von Kleinmolekülen, ausgehend von existierenden Koordinaten oder einfach der Strukturformel des Moleküls. Diese können dann in der Strukturverfeinerung von Protein–Ligand-Komplexen eingesetzt werden.^[259]

Website: http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg_beta

PSIPRED

Der PSIPRED-Server wurde zur Voraussage von Proteinsekundärstrukturen genutzt. Dabei werden direkt die Ergebnisse eines PSI-BLAST-Jobs genutzt, ein zeit- und rechenintensiver multipler Sequenzvergleich ist nicht nötig. Zwei neurale Netzwerke analysieren und filtern im Folgenden die Daten.^[260-261]

Website: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

PyMOL

Bei PyMOL handelt es sich um ein Programm zur graphischen Darstellung von makromolekularen Strukturen. Alle in dieser Arbeit gezeigten Strukturabbildungen wurden mit PyMOL erzeugt.^[262]

SignalP 3.0

Der SignalP 3.0-Server sagt die Anwesenheit und Lokalisierung von Signalpeptiden und deren Schnittstellen anhand einer AS-Sequenz voraus. Dabei ist es wichtig zwischen den Sequenzen von Gram-positiven, Gram-negativen und eukaryotischen Proteinen zu unterscheiden, da die neuronalen Netzwerke die zur Vorhersage eingesetzt werden nur auf jeweils eine Klasse trainiert sind. Die Vorhersage von Signalpeptidsequenzen in Archae-Bakterien ist derzeit nicht möglich, da es zu wenige bekannte Beispiele gibt um eine zuverlässige Vorhersage zu machen.^[263-265]

Website: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

SSM

Der in Coot implementierte Secondary Structure Matching-(SSM)-Algorithmus wurde verwendet im *apo*- und *holo*-Strukturen zu überlagern und die *rmsd*-Werte ihrer C_α-Positionen zu berechnen.^[266]

T-Coffee

Mit dem T-Coffee-Server ist es möglich, multiple Sequenzvergleiche durchzuführen. Dabei ist es möglich die Ergebnisse, die mit verschiedenen Methoden erhalten werden zu kombinieren.^[267]

Website: <http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>

3.7 Isolierung von Bacillibactin

3.7.1 Ethylacetatextraktion

Zur Extraktion von Bacillibactin wurde der Überstand einer 300 mL *B. subtilis* ATCC 21332-Kultur (Pelletierung der Zellen durch 15 min Zentrifugation bei 8281·g) mit konz. HCl auf einen pH-Wert von 3.0 angesäuert. Anschließend erfolgte dreimalige Extraktion mit je 300 mL EtOAc im Scheidetrichter. Die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt und der gelbe Rückstand in 7 mL 50% (v/v) MeOH aufgenommen. Nach 15 min Zentrifugation (3000·g) wurde der Überstand filtriert und mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt (Nucleodur C-18 ec 25 mm × 250 mm, Gradient: 5-60% (v/v) MeCN/H₂O/0.1% (v/v) TFA in 30 min, 16 mL min⁻¹, 8 mL-Fractionen). Die Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF auf ihren Bacillibactingehalt untersucht, die positiv getesteten Fraktionen vereinigt und in einer Alpha 2-4-LSC Gefriertrocknungsanlage (Christ) lyophilisiert.

3.7.2 Festphasenextraktion der Kulturüberstände mit XAD-16

Die Vorbereitung des Kulturüberstands erfolgte analog der Ethylacetatextraktion. Der Kulturüberstand wurde nach dem Ansäuern mit 10 mL XAD-16-Suspension (50 g/200 mL) versetzt und für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das XAD-16-Harz auf Filterpapier aufgefangen und zunächst mit 50 mL bd. H₂O gewaschen. Dann erfolgte die Elution des braunen Harzes mit 50 mL MeOH, die Farbe des Harzes war danach wieder weiß. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf 5 mL eingengt, mit 5 mL bd. H₂O versetzt und anschließend analog zur Ethylacetatextraktion mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

3.8 Affinitätschromatographische Proteinidentifizierung aus Zellextrakten

3.8.1 Probenvorbereitung

Zunächst wurde eine ÜTK des Stammes *Bacillus subtilis* BMM100 ($\Delta dhbC$) in LB-Medium angezogen, woraus im Verhältnis 1:1000 eine ÜNK in eisenlimitiertem BOC-Minimalmedium inokuliert wurde. Aus dieser ÜNK wurden 3 L BOC-MM in Polycarbonatkolben im Verhältnis 1:1000 inokuliert und für verschiedene Zeiträume bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. In der frühen exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 8 h) wurde 2,2'-Bipyridyl (2,2'-BPD) zu einer Endkonzentration von 100 mmol L⁻¹ zugegeben um verbleibende Eisenspuren zu entfernen. Die Zellen wurden durch 20 min Zentrifugation mit 8300-*g* bei 4 °C geerntet und in 2 mL PBS welche mit 0.1% (v/v) Tween® 20 (*Roth*) versetzt war, aufgenommen. Der Zellaufschluss wurde unter Eiskühlung in sechs Intervallen von 30 s mit Pausen von je 30 s durchgeführt. Dazu wurde ein Sonoplus HD 200-Gerät (*Bandelin*) mit 30% der Maximalleistung und einem Arbeitsintervall von 80% verwendet. Die Zelltrümmer wurden durch zweimalige Zentrifugation für 20 min, mit 16100-*g* bei 4 °C entfernt und das Zelllysate partikelfrei filtriert ((Ultrafree-MC (0.22 µm, *Millipore*) oder Filtropur S 0.2 (*Sarstedt*)).

3.8.2 Affinitätschromatographie

Biotinyl-Petrobactin (Biotinyl-PB) wurde von Nikolas Bugdahn (AG Dr. Oberthür, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg) synthetisiert (Syntheseroute siehe [200]). Für ein typisches affinitätschromatographisches Experiment wurden etwa 5 mg Biotinyl-PB in 350 µL DMSO gelöst und durch Zugabe von 350 µL aq. FeCl₃-Lösung in 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 quantitativ mit Eisen beladen, um eine Lösung mit der Konzentration 7.13 mmol L⁻¹ zu erhalten. Mit dieser Lösung wurden 0.5 mL einer 50% (w/v)-Suspension von Streptavidin-derivatisierter Agarose (*Sigma*) unter Lichtabschluss für 1 h bei RT unter schwachem Rollen und Taumeln inkubiert. Die Suspension wurde dann in 0.8 cm × 4 cm Poly-Prep® Chromatographie-Säulen (*Bio-Rad*) gefüllt und mit 10 C_v PBS äquilibriert. Der wie oben beschrieben präparierte Kulturüberstand wurde per Durchflussmethode auf die Säule aufgegeben und die Säule anschließend mit 10 C_v PBS gewaschen, die Elution erfolgte mit 4 C_v aq. GuHCl-Lösung (c = 6 mol L⁻¹). Die ganze Prozedur ab der Eisen(III)-Beladung von

Biotinyl-PB wurde bei 18 °C und unter Rotlichtbedingungen ($\lambda = 629 \text{ nm}$) ausgeführt. Hierzu wurden Zelllysatsproben aus verschiedenen Wachstumsphasen (exponentielle Phase, frühe stationäre Phase, späte stationäre Phase) verwendet.

Die Elutionsfraktionen wurden zwei- bis dreifach gegen 2 L leicht gepuffertes bd. H_2O (1 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8.0) unter Verwendung von Slide-A-Lyzer® Dialyse-Kassetten (MWCO: 10000 Da, *Thermo Scientific*) oder Spectra/Por® 3 regenerierten Cellulose Dialyse-Membranen (MWCO: 3500 Da) dialysiert. Das Dialysat wurde dann an einer Alpha 2-4 LSC Gefriertrocknungsanlage (*Christ*) lyophilisiert.

3.8.3 Proteinidentifizierung

Die Proteinproben wurden in $20 \mu\text{L}$ NH_4HCO_3 -Lösung (50 mmol L^{-1} pH 7.8) aufgenommen und mit illustra™ AutoSeq™ G-50 Dye Terminator Spin-Säulen (*GE Healthcare*) entsalzt. Dann erfolgte der tryptische Verdau direkt in Lösung durch Zugabe von Sequencing Grade Modified Trypsin (*Promega*) in einem Verhältnis von $\approx 1:20$ (w/v), welches direkt vor Gebrauch in 50 mmol L^{-1} NH_4HCO_3 -Puffer, pH 7.8 gelöst wurde. Die Verdau wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde mit einem Qstar Pulsar i QqTOF-Instrument (*Applied Biosystems*) durchgeführt. Dazu wurde ein Ultima nano-HPLC system (*Dionex*), ausgerüstet mit einer nano-C18 RP-Säule (innerer Durchmesser: $75 \mu\text{m}$, Länge: 150 mm, Pep-Map C18-Material, $5 \mu\text{m}$, Porengröße: 100 \AA) durch eine Protana Nanospray-Quelle online verbunden. Die Injektion von $20 \mu\text{L}$ tryptischem Verdau wurde durch einen Famos Autosampler (*Dionex*) durchgeführt. Automatisches Fangen und Entsalten der Probe wurde mit einem Switchos-Modul (*Dionex*) bei einer Flussrate von $30 \mu\text{L min}^{-1}$ unter Benutzung von $\text{H}_2\text{O}/0.05\%$ Ameisensäure als Lösungsmittel durchgeführt.

Die Trennung der tryptischen Peptide wurde mit einem Gradient von 5%-50% Puffer B (80% MeCN/0.045% Ameisensäure) erreicht (Puffer A: $\text{H}_2\text{O}/0.05\%$ Ameisensäure), bei einer angelegten Flussrate von 200 nL min^{-1} . Die Säule war mit einem Nanoemitter (*New Objective*) verbunden und der Eluent wurde unter Anwendung einer Spannung von 2800 V direkt in die Öffnung des Massenspektrometers gesprüht. Ein Aufnahmescan wurde kombiniert mit zwei datenabhängigen MS/MS-Scans, unter Verwendung eines dynamischen Ausschlusses von 20 s. Tandem-Massenspektren wurden unter Verwendung von N_2 als CID-Gas erhalten. Dabei wurden die Kollisionsenergien abhängig von Masse und Ladung des Vorläuferions automatisch gesetzt. Die Analyse der Daten wurde durch die MASCOT-Software (Version 2.2, *Matrix Science*) unter Benutzung der MSDB-Datenbank erhalten.^[222]

Die Proteinidentifizierung inklusive dem vorherigen tryptischen Verdau wurde von Dr. Uwe Linne und Natalia Fritzler (Abteilung Massenspektrometrie, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung des Petrobactin-Bindungsproteins FpiA aus *Bacillus subtilis*

4.1.1 Isolierung und Identifizierung – Ergebnisse der Affinitätschromatographie

4.1.1.1 Allgemeines Prinzip

Die Identifizierung unbekannter Siderophorbindungsproteine stellt den ersten Schritt in einer umfassenden Charakterisierung dieser Proteine und Bewertung hinsichtlich ihres Potentials für weitere Anwendungen dar. Hier soll die prinzipielle experimentelle Durchführung zur Isolierung und Identifizierung eines Petrobactin-bindenden Proteins dargestellt werden.

Die allgemein zugrundeliegende Methodik die hier zur Identifizierung angewandt wurde ist die Affinitätschromatographie. Sie beruht auf der spezifischen Interaktion eines Bindungspartners mit einem anderen, z.B. eines Proteins mit einem Liganden. Die Affinitätschromatographie ist dabei umso erfolgsversprechender, je spezifischer und je stärker die Wechselwirkung zwischen den Partnern ist. Die wohl wichtigste Anwendung im Labor erfährt diese Methode in der Reinigung rekombinanter Proteine, beispielsweise durch Ni^{2+} -NTA-Chromatographie, bei der auf Agarose immobilisiertes

Ni^{2+} -NTA-Material als stationäre Phase dient, welches His-getagte Proteine der mobilen Phase zu binden vermag.^[219-220] Ein weiteres wichtiges System ist die Verwendung von immobilisiertem Streptavidin. Dabei macht man sich die Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin zu Nutze, einer der stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen in der Natur.^[268]

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Affinitätschromatographie-basiertes System entwickelt, das die selektive Identifizierung eines Petrobactin-Bindungsproteins aus dem Zelllysat von

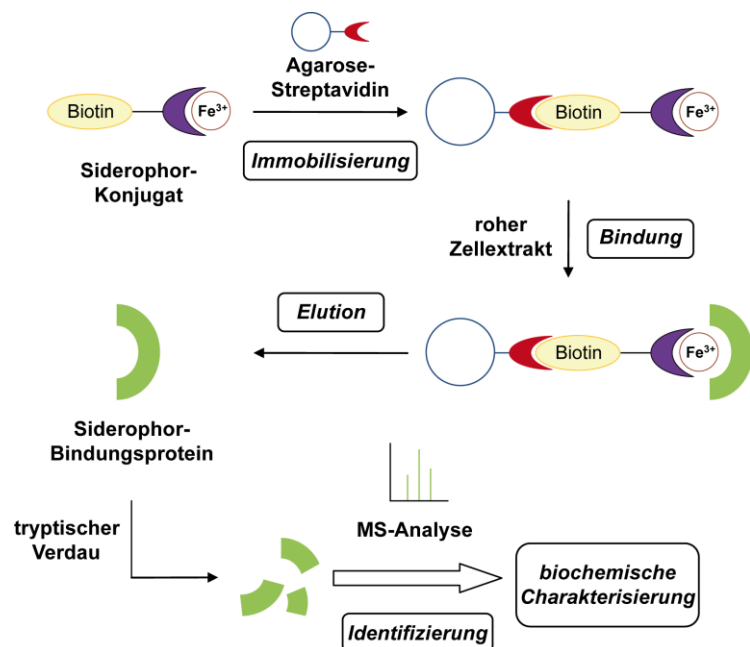


Abbildung 4-1: Allgemeines Schema der affinitätschromatographischen Identifizierung von Siderophor-Bindungsproteinen.

Die zurückgehaltenen Proteine werden massenspektrometrisch identifiziert und anschließend biochemisch charakterisiert.

Bacillus subtilis erlaubte, welches zu Beginn dieser Arbeit noch unbekannt war. Die wichtigsten Schritte sind in Abb. 4-1 dargestellt. Nach der **Immobilisierung** des *Siderophorkonjugats* auf der stationären Phase *Agarose–Streptavidin* erfolgt die **Bindung** potentieller Interaktionspartner durch Zugabe eines *rohen Zellextrakts*. Der **Elution** der Proteine schließt sich ein *tryptischer Verdau* an, der die *massenspektrometrische Analyse* und **Identifizierung** der zurückgehaltenen Proteine möglich macht. Abschließend erfolgt dann die **biochemische Charakterisierung** der Proteine.

4.1.1.2 Immobilisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Streptavidin-modifizierte Agarose, die mit biotinyliertem Petrobactin (Biotinyl-PB, Abb. 4-2A) beladen wurde, als stationäre Phase verwendet. Neben ausreichenden Mengen von nativem PB für die biochemische Charakterisierung des Importproteins wurde Biotinyl-PB von Nikolas Bugdahn (AG Dr. Oberthür, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg) synthetisiert. Dabei wurde die Biotingruppe über γ -Aminobuttersäure als Linker mit der zentralen Aminogruppe einer der Spermidineinheiten von PB verknüpft, da diese nicht direkt an der Koordination von Eisen(III) beteiligt sind (genaue Synthese siehe [200]). Nichtsdestoweniger bestand die Möglichkeit, dass das stark modifizierte Biotinyl-PB wegen des sterischen Anspruchs der zusätzlich angebrachten Seitenkette nicht mehr in der Lage sein würde Eisen(III) zu binden.

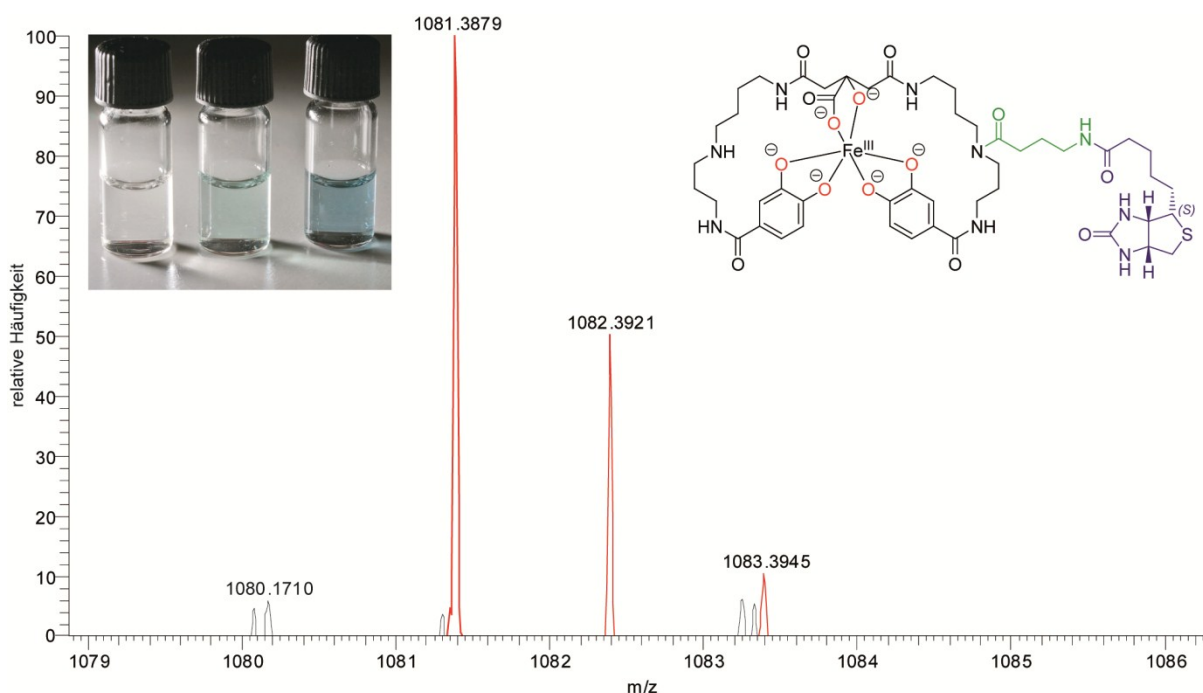


Abbildung 4-2: Bildung des Eisen(III)-Komplexes von Biotinyl-Petrobactin.

Gezeigt ist das ESI-Massenspektrum des Komplexes $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$. Der Haupt- und die zugehörigen Isotopenpeaks sind rot hervorgehoben. Eine Fotografie der Farbänderung einer Lösung von Biotinyl-PB bei pH 8.0 nach Zugabe verschiedener Mengen FeCl_3 ist links eingesetzt (Fotographie: Timm Schlosser, AG Prof. Dr. Geyer, FB Chemie, Philipps-Universität Marburg). Die Strukturformel von Biotinyl-PB ist rechts eingesetzt. Das Siderophor ist in schwarz, der Linker in grün und Biotin in blau hervorgehoben.

Eine starke Farbausbildung von dunkelblau/violett gab den ersten Hinweis auf die Bildung eines Eisen(III)–Siderophor-Komplexes wenn Biotinyl-PB mit einer äquimolaren Menge FeCl_3 versetzt wurde. Dies wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt (Abb. 4-2, HRMS (ESI): berechnet für $[\text{C}_{48}\text{H}_{67}\text{Fe}_1\text{N}_9\text{O}_{14}\text{S}]^-$: 1081.3885, gefunden: 1081.3879). Dabei war der pH-Wert der zugegebenen FeCl_3 -Lösung von entscheidender Bedeutung: Nur Lösungen mit $\text{pH} \geq 8.0$ vermochten eine deutliche Farbänderung und damit die Bildung des Komplexes hervorzurufen. Nach der Bildung des Eisen(III)–Siderophorkonjugat-Komplexes erfolgte dessen Immobilisierung auf der Agarose–Streptavidin-Matrix.

4.1.1.3 Anzucht der Zellen

Als Ausgangsbasis für die Herstellung des Zelllysats wurde der Stamm *B. subtilis* BMM100 ($\Delta dhbC$) verwendet.^[191] In diesem wurde das Gen für die Isochorismat-Synthase deletiert, daher ist er weder in der Lage 2,3-Dihydroxybenzoat, noch Bacillibactin als endogene, hochaffine Eisenchelatoren herzustellen.^[27-28] Da die für Siderophorimportsysteme codierenden Gene neben zahlreichen anderen unter der Kontrolle des Fur-Repressors stehen, wurde der Stamm generell unter eisenlimitierten Bedingungen in Minimalmedium angezogen. Zusätzlich wurde kurz vor Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (nach ca. 8 h) der Eisenchelator 2,2'-Bipyridyl zugegeben, um verbleibende Spuren von Eisen aus dem Medium zu entfernen. Dann wurden Proben aus verschiedenen Wachstumsphasen genommen (frühe exponentielle Phase, späte exponentielle Phase, stationäre Phase), um deren Einfluss auf die Identifizierung bestimmen zu können.

Es stellte sich heraus, dass für eine erfolgreiche Identifizierung nur Zellen aus der stationären Wachstumsphase geeignet waren, daher wurden in späteren Reproduktions- und Verbesserungsexperimenten ausschließlich solche Zellen verwendet (Wachstum für ca. 48 h).

4.1.1.4 Bindung

Auf die in eine Säule gepackte stationäre Phase wurde ein *B. subtilis*-Zelllysat aufgegeben, das vor dem Zellaufschluss mit 0.1% (v/v) des Detergenz Tween® 20 versetzt wurde. Da SBP in Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis*, über Lipidmodifikationen am N-Terminus in der Cytoplasmamembran verankert sind, sollte durch das Detergenz eine verbesserte Herauslösung aus der Membran und damit eine vereinfachte Isolierung erreicht werden.

In der Regel wurden die Zellen unter Verwendung von Ultraschall aufgeschlossen und das Zelllysat nach Entfernung der Zelltrümmer direkt verwendet. Ein weiterer Ansatz bestand in einer sog. Membranpräparation. Die im Zelllysat befindliche Membran wird dabei durch Ultrazentrifugation pelletiert und kann so separiert werden. Da mit diesen Modifikationen jedoch in mehreren Versuchen keine positive Identifizierung möglich war, wurde für Reproduktions- und Verbesserungsexperimente nur das wie zuvor beschrieben präparierte Zelllysate verwendet. Teilweise wurden die Zelllysate zweifach auf die Säule aufgetragen, um eine verbesserte Bindung zu erreichen. Dies steigerte jedoch auch die unspezifische Bindung auf der Säule und wurde daher nicht weiter verfolgt.

In späteren Experimenten wurde die stationäre Phase vor der Aufgabe des Zelllysats mit einer konzentrierten BSA-Lösung behandelt, um die Bindungsstellen an der Agarose–Streptavidin-Matrix selbst abzusättigen und die spezifische Interaktion mit dem Liganden zu begünstigen.

4.1.1.5 Elution

Nach Aufgabe des Zelllysats wurde die Säule mehrfach gewaschen und die noch gebundenen Proteine anschließend mit GuHCl-Lösung ($c = 6 \text{ mol L}^{-1}$) eluiert. Neben dieser Standardprozedur erfolgten teilweise zunächst Waschschrte mit Lösungen hoher Salzkonzentration (500 bzw. $1000 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$), während die sich anschließende Elution mit schrittweise steigenden GuHCl-Konzentrationen durchgeführt wurde ($c = 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 \text{ mol L}^{-1}$). Da dies jedoch nicht zu einer erfolgreichen Identifizierung führte und auch die unspezifischen Bindungen nicht merklich reduzierte, wurde in den nachfolgenden Reproduktions- und Verbesserungsexperimenten darauf verzichtet. Eine alternative Elution mit einem Überschuss des $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Komplexes führte aufgrund der Präzipitation desselben ebenfalls nicht zum Erfolg.

Die Elutionsfraktionen wurden über 2 Tage zwei- bis dreimal gegen einen großen Überschuss leicht gepuffertes bd. H_2O dialysiert, um das GuHCl zu entfernen, das den anschließenden tryptischen Verdau gestört hätte.

4.1.1.6 Tryptischer Verdau und Identifizierung

Da das Volumen der Elutionsfraktionen für den tryptischen Verdau ungeeignet war, wurden die Proben zunächst lyophilisiert und dann in einem geringen Volumen eines geeigneten Puffers aufgenommen. In ersten Experimenten zeigte sich, dass ein erfolgreicher Verdau und die nachfolgende Identifizierung mit diesen Proben nicht möglich war. Dies wurde auf die drastisch erhöhte Salzkonzentration nach der Gefriertrocknung des Dialysats und die anschließende Wiederaufnahme der Probe in einem deutlich reduzierten Volumen zurückgeführt. Daher wurden alle weiteren Proben vor dem tryptischen Verdau zunächst mit Gelfiltrationssäulen entsalzt.

Ein tryptischer Verdau ÜN erwies sich als vorteilhaft für die nachfolgende Identifizierung. In den ersten Experimenten zeigte sich, dass das Protein YclQ aus *B. subtilis* das einzige war, welches wiederholt von der Säule zurückgehalten wurde. Es war darüber hinaus das einzige, welches in den Datenbanken als Siderophorbindungsprotein annotiert war (Tab. 4-1). Daher schritt mit dieser Information die physiologische und biochemische Charakterisierung (s.u.) voran. Parallel dazu wurde die Verbesserung der Identifizierungsergebnisse forciert.

Tabelle 4-1: Identifizierte Proteine in einem typischen Anfangsexperiment.

Protein-Abkürzung	Protein-Beschreibung (UniProt)	Score
Als	Acetolactatsynthase	214
YetG	putative Monooxygenase YetG	209
HBsu	DNA-Bindungsprotein HU 1	203
GroS	10 kDa Chaperonin	193
FpiA (YclQ)	uncharakterisiertes ABC-Transporter-Solut-Bindungsprotein YclQ	165
PdhB	Pyruvatdehydrogenase E1-Komponente Untereinheit beta	55
MetG	Methionyl-tRNA-Synthetase	48
YvbK	uncharakterisierte N-Acetyltransferase YvbK	46
PdhC	Dihydrolipoyllysinrest Acetyltransferase, Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	43

Alle identifizierten Proteine mit einem Score-Wert unter 40 wurden ausgeschlossen.

Da neben YclQ zahlreiche andere Proteine mit zum Teil größeren Sicherheiten identifiziert wurden, wurde der Grad an unspezifischer Bindung an die Säule untersucht. Hierzu wurde unmodifiziertes Agarose–Streptavidin-Material unter denselben Bedingungen für die Identifizierungsexperimente eingesetzt, wie das mit Siderophorkonjugat beladene Material. Es zeigte sich, dass zahlreiche in den ersten Experimenten wiederholt zurückgehaltene Proteine von der Matrix selbst retardiert wurden. Dabei handelte es sich oftmals um Proteine die in großer Häufigkeit in Zellen vorkommen, wie beispielsweise das Chaperonin GroS (Tab. 4-2).

Tabelle 4-2: Identifizierte Proteine in einem typischen Negativkontrollexperiment.

Protein-Abkürzung	Protein-Beschreibung (UniProt)	Score
PdhC	Dihydrolipoyllysinrest Acetyltransferase, Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	195
HBsu	DNA-Bindungsprotein HU 1	158
IlvC	Ketolsäure-Reduktoisomerase	111
PdhB	Pyruvatdehydrogenase E1-Komponente Untereinheit beta	84
PdhD	Dihydrolipoyldehydrogenase	61
GroS	10 kDa Chaperonin	48
MetE	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamat-homocystein- Methyltransferase	43

Alle identifizierten Proteine mit einem Score-Wert unter 40 wurden ausgeschlossen.

Wurden diese Ergebnisse subtraktiv auf die ersten Experimente bezogen, stieg YclQ in der Reihenfolge der sicheren Identifizierungen nach oben. Um die unspezifische Bindung von vorneherein deutlich zu reduzieren, erwies sich die Behandlung des Materials mit BSA als vorteilhaft. BSA sättigte die auf der Agarose–Streptavidin-Matrix vorhandenen Bindungsstellen ab. Dies führte zu einer deutlichen Verminderung der zuvor beobachteten unspezifischen Interaktionen von Proteinen

mit der Säulenmatrix. Die damit verbundene Identifizierung zahlreicher Proteine konnte so drastisch reduziert werden (Tab. 4-3).

Tabelle 4-3: Identifizierte Proteine in einem typischen Experiment nach BSA-Behandlung.

Protein-Abkürzung	Protein-Beschreibung (UniProt)	Score
HBsu	DNA-Bindungsprotein HU 1	108
FpiA (YclQ)	uncharakterisiertes ABC-Transporter-Solut-Bindungsprotein YclQ	83
Mfd	Transkriptionsreparatur-Kopplungsfaktor	55

Alle identifizierten Proteine mit einem Score-Wert unter 40 wurden ausgeschlossen.

4.1.2 Bioinformatische Charakterisierung

Nach der gesicherten Identifizierung von YclQ wurde zunächst der Gencluster betrachtet in dem YclQ enthalten ist, *yclMNOPQ*. Da *yclM* voraussichtlich für eine Aspartatkinase codiert und ausserdem eine andere Leserichtung aufweist, wurde dieses Gen nicht weiter betrachtet. Die Genprodukte von *yclNO* bilden zusammen die Membranpermease eines ABC-Transporters, *yclP* codiert für das zugehörige ATP-Bindungskassettenprotein. Aufgrund seiner Funktion wurde der *yclNOPQ*-Gencluster in *fpiBCDA* umbenannt und YclQ entsprechend in FpiA (engl.: *ferric petrobactin import*).^[200] Der Gencluster ist in Abb. 4-3 dargestellt und Tab. 4-4. zeigt eine Beschreibung der Proteine

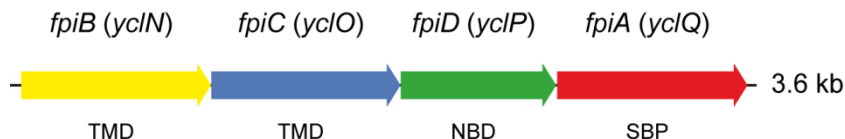


Abbildung 4-3: *fpiBCDA*-Gencluster.

TMD: Transmembrandomäne, NBD: Nukleotidbindungsdomäne, SBP: Substratbindungsprotein.

Tabelle 4-4: Proteine des *fpiBCDA*-Genclusters.

Protein-Abkürzung	Protein-Beschreibung (UniProt)	UniProt-Nummer	MW/kDa
FpiB (YclN)	uncharakterisiertes ABC-Transporter Permeasenprotein YclN	P94418	34.90
FpiC (YclO)	uncharakterisiertes ABC-Transporter Permeasenprotein YclO	P94419	35.47
FpiD (YclP)	uncharakterisiertes ABC-Transporter ATP-Bindungsprotein YclP	P94420	28.48
FpiA (YclQ)	uncharakterisiertes ABC-Transporter- Solut-Bindungsprotein YclQ	P94421	34.79

MW: Molekulargewicht.

Eine BLAST-Suche zeigte die Homologie von FpiA zu zahlreichen weiteren Siderophorbindungsproteinen. Diese stammten vorwiegend aus anderen Bacilli, jedoch auch aus weiteren, weniger stark verwandten Organismen. Darunter waren auch Proteine zu finden, die nachweislich andere Siderophore binden, wie beispielsweise das Enterobactin-Bindungsprotein CeuE aus *Campylobacter jejuni*.

Sekundärstrukturvorhersagen zeigten eine lange α -Helix in der Mitte der Sequenz, die für die Superfamilie der sog. Helixrückgrat-Metallrezeptoren (engl.: *helical backbone metal receptors*) typisch ist. Etwa zeitgleich mit den hier vorgelegten Untersuchungen wurde eine Kristallstruktur von FpiA (YclQ) in der PDB hinterlegt (PDB-Code: 3GFV), die diese strukturellen Charakteristika bestätigte.^[269]

Der SignalP 3.0-Server sagte die Anwesenheit eines Signalpeptids voraus, wie es für Substratbindungsproteine typisch ist. Signalpeptidsequenzen zeichnen sich durch einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren (AS) aus. Der AS-Rest C20 des annotierten Proteins stellt dabei mit größter Wahrscheinlichkeit den Anknüpfungspunkt für den Lipidanker dar. Sowohl die automatische Suche mit dem LipoP 1.0-Server,^[256] als auch die manuelle Anwendung von Suchparametern für Gram-positive Bakterien identifizierten diesen Rest.^[257,270-271]

Im Verlauf dieser Arbeit wurden in den pathogenen Organismen *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus* die Proteine FatB und FpuA als SBP für Petrobactin identifiziert. Ein Vergleich dieser Proteine mit FpiA ist in Tab. 4-5 gezeigt.

Tabelle 4-5: Vergleich der Proteine FatB und FpuA aus *B. anthracis* und *B. cereus* mit FpiA aus *B. subtilis*.

Protein (Organismus)	Sequenzidentität/-ähnlichkeit	E-Wert
FatB (<i>B. anthracis</i>)	30%/51%	$1 \cdot 10^{-29}$
FatB (<i>B. cereus</i>)	32%/52%	$6 \cdot 10^{-30}$
FpuA (<i>B. anthracis</i>)	33%/52%	$1 \cdot 10^{-14}$
FpuA (<i>B. cereus</i>)	33%/52%	$8 \cdot 10^{-15}$

Bezogen auf die Stämme *B. subtilis* MR 168, *B. anthracis* str. Sterne und *B. cereus* ATCC 14579.

4.1.3 Bestätigung der physiologischen Relevanz von FpiA

Im nächsten Schritt galt es, die physiologische Relevanz des Substratbindungsproteins FpiA zu bestätigen. Dazu wurde eine FpiA-Deletionsmutante erstellt, als genetischer Hintergrund diente hierbei der Stamm *B. subtilis* BMM100 ($\Delta dhbC::erm$). Dieser ist, wie bereits erwähnt, aufgrund des deletierten Gens für die Isochorismat-Synthase nicht in der Lage Bacillibactin oder dessen Vorläufer 2,3-DHB zu synthetisieren. Dies erschien wichtig, um eine Beeinflussung der Wachstumsexperimente durch diese endogenen, hochaffinen Eisen(III)-Chelatoren auszuschließen.

Die Doppelmutante *B. subtilis* AA005 ($\Delta dhbC::erm \Delta fpiA::kan$) wurde unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen und mit der Einzelmutante verglichen (Abb. 4-4). Generell wurde in eisenlimitiertem Medium gearbeitet und verschiedene Additive zugesetzt.

Das Wachstum unter Normalbedingungen war bei beiden Mutanten vergleichbar. Ebenso zeigten beide Mutanten erhöhtes Wachstum, wenn *apo-BB* zum Medium zugesetzt wurde, was aufgrund des intakten FeuABC-YusV₂-Transporters erwartet wurde. Der wachstumsbefördernde Effekt ist allerdings geringer als bei der direkten Zugabe zusätzlichen freien Eisens zum Medium in Form einer FeCl₃-Lösung.

Ein drastischer Unterschied im Wachstum der beiden

Mutanten war zu beobachten, wenn *apo-PB* supplementiert wurde. Während die Einzelmutante erhöhtes Wachstum verglichen mit den eisenlimitierten Bedingungen zeigte (etwa im Rahmen der *apo-BB*-Supplementation) zeigte die Doppelmutante gar kein weiteres Wachstum. Dieser eindeutige Phänotyp zeigte damit die physiologische Relevanz von FpiA, welche unabhängig davon von Zawadzka *et al.* bestätigt wurde.^[269]

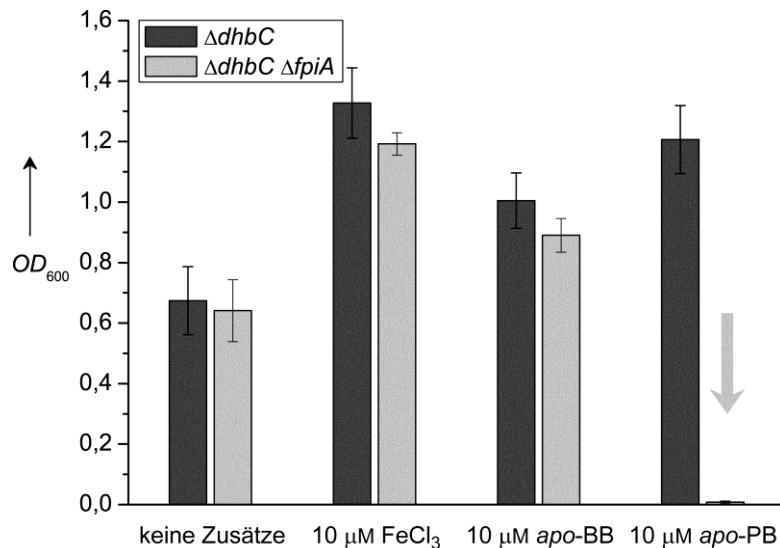


Abbildung 4-4: Wachstumsexperimente.

Gezeigt sind die endgültigen OD₆₀₀-Werte (nach 18 h) der $\Delta dhbC$ - und $\Delta dhbC \Delta fpiA$ -Kulturen mit verschiedenen Additiven. Der graue Pfeil verdeutlicht die vollständige Inhibition des Wachstums der Doppelmutante bei Zugabe von *apo-PB*. Die gezeigten Daten wurden Dr. Marcus Miethke aufgenommen.

4.1.4 Charakterisierung von FpiA und [Fe^{III}(PB)]³⁻

4.1.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Das *fpiA*-Gen wurde ohne seine N-terminale Signalpeptidsequenz und das darauffolgende Cystein-Codon (C20), dem wahrscheinlichsten Anknüpfungspunkt für den Lipidanker kloniert. Das C-terminale His₆-Fusionsprotein konnte in *Escherichia coli* mit sehr guten Ausbeuten überproduziert und mittels Ni²⁺-NTA- und Größenausschlusschromatographie zu sehr großer Homogenität gereinigt werden (Abb. 4-5). Die Ausbeute nach SEC lag bei > 20 mg Protein/L Kultur. Das Protein besitzt eine Molmasse von 33.87 kDa und einen pI-Wert von etwa 6.6.

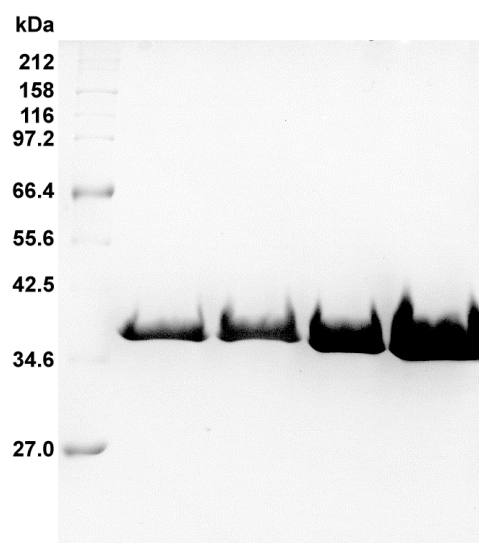


Abbildung 4-5: SDS-PAGE mehrerer SEC-Fractionen von rekombinantem FpiA.

4.1.4.2 Fluoreszenzspektroskopie – Ligandenbindung und -affinität

Das rekombinante Protein FpiA wurde auf seine Fähigkeit zur Bindung verschiedener möglicher Liganden untersucht. Neben dem Eisenkomplex von Petrobactin ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$) wurden auch die Eisenkomplexe von Biotinyl-Petrobactin ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$), Bacillibactin ($[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$) sowie den Siderophorvorläufern 3,4- und 2,3-DHB getestet. Bei ersten Messungen mit einer Proteinkonzentration von $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ wurde die abschließende Löschung der Fluoreszenz erst bei einer $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Konzentration von $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ beobachtet, anders als es für die hochaffine Bindung eines Siderophors durch sein SBP zu erwarten war. Das Protein/Ligand-Verhältnis beträgt in diesem Fall offenbar 1:4 (Abb. 4-6).

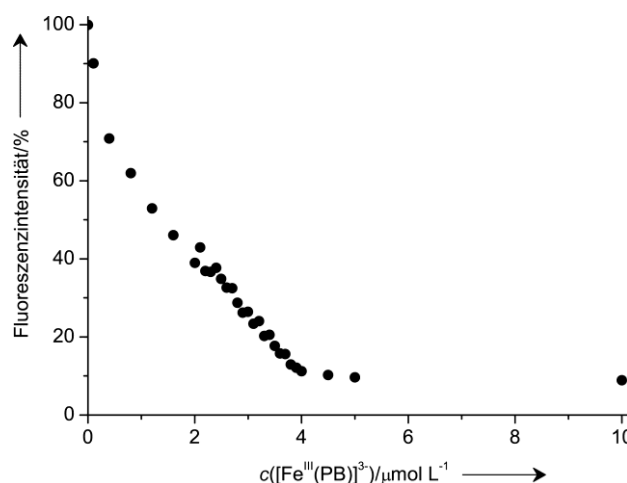


Abbildung 4-6: Analyse der Fluoreszenzlöschung von FpiA durch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$.

c: Konzentration.

Tabelle 4-6: Bindungsaffinitäten von FpiA gegenüber möglichen Liganden bei pH 8.0.

Ligand	K_D	K_D (nach Lit. [269])
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$	$51 \pm 17 \text{ nmol L}^{-1}$	$113 \pm 4 \text{ nmol L}^{-1}$
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$	$18 \pm 3 \mu\text{mol L}^{-1}$	–
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	$2.1 \pm 0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$	– ^[a]
$[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$	$1 \pm 1 \text{ nmol L}^{-1\text{[b]}}$	$4.2 \pm 1 \text{ nmol L}^{-1\text{[c]}}$
$[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$	$286 \pm 21 \text{ nmol L}^{-1}$	$1.23 \pm 0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$

[a] Den Autoren zufolge konnte keine „spezifische Interaktion“ zwischen FpiA (YclQ) und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ beobachtet werden.

[b] Die hohe Standardabweichung ist in der äußerst hohen Affinität von FpiA gegenüber $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ begründet, die um ein vielfaches niedriger ist, als die für die Messungen benötigte minimale Konzentration. Vergleiche hierzu auch [156] und [159].

[c] Den Autoren zufolge bildet 3,4-DHB unter ihren experimentellen Bedingungen eine Mischung aus ML- und ML_2 -Komplexen.

K_D : Dissoziationskonstante.

Die weiteren Messungen zeigten hochaffine Bindungen von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ im unteren nanomolaren Bereich sowie geringere Affinitäten zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ im hohen nanomolaren bis mittleren mikromolaren Bereich. Die ermittelten Affinitäten sind in Tab. 4-6 angegeben und die aufgenommenen Fluoreszenzmessungen in Abb. 4-7 dargestellt. Das Protein FpiA wurde in einer parallelen Arbeit ebenfalls charakterisiert, daher sind die

dort erhaltenen Werte zum Vergleich angegeben. In der eigenen Auswertung für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ wurde die oben beschriebene 1:4-Stöchiometrie für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ bereits berücksichtigt.

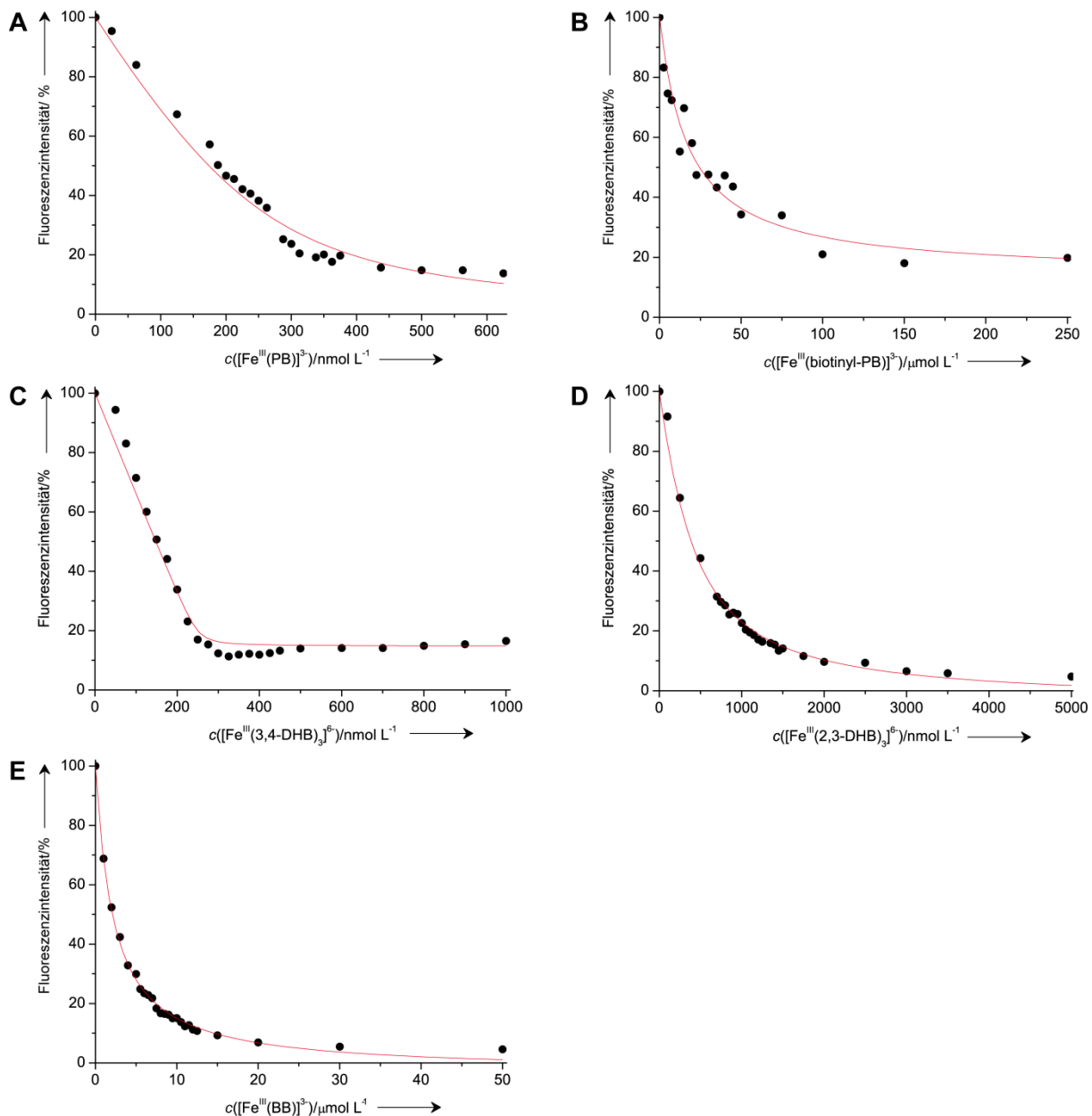


Abbildung 4-7: Analyse der Fluoreszenzlösung von FpiA durch verschiedene Liganden.

A) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$. C) $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$. D) $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$. E) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. c: Konzentration.

Es ist besonders zu beachten, dass die Affinität von FpiA zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ deutlich höher als die zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ ist und weiterhin, dass sich die ermittelten Werte für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$ um fast drei Größenordnungen unterscheiden.

4.1.4.3 Circulardichroismus-Spektroskopie – Proteinfaltung und -stabilität, Ligandenkonfiguration

Proteinfaltung

Die Untersuchung des Proteins mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte deutlich die vorhergesagte, hauptsächlich α -helikale Struktur des Proteins (Abb. 4-8). Diese ist insbesondere charakterisiert durch zwei Minima bei etwa 210 und 222 nm. Geringe Abweichungen von diesen Idealwerten sind auf den Anteil der β -Faltblätter am Gesamteinspektrogramm zurückzuführen.

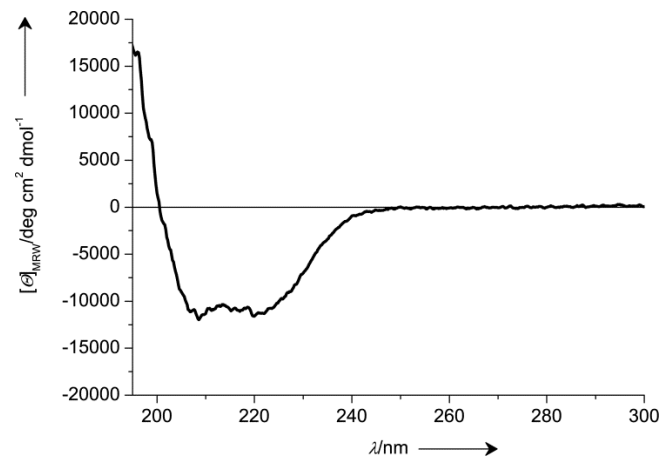


Abbildung 4-8: Fern-UV-CD-Spektrum von FpiA.

$[\theta]_{MRW}$: mittlere molare Elliptizität pro AS, λ : Wellenlänge.

Proteinstabilität

Ausgehend von diesem Spektrum wurde die thermische Stabilität des Proteins mit ligandenabhängiger Schmelzpunktanalyse bei einer konstanten Wellenlänge von 222 nm getestet. Repräsentative Schmelzkurven sind in Abb. 4-9 gezeigt.

Hierbei konnte die Bindungsstöchiometrie, die aus den Fluoreszenztitrationen abgeleitet wurde, bestätigt werden. Eine maximale thermische Stabilisierung von FpiA wurde mit einem Protein/Ligand-Verhältnis von 1:4 und höher erreicht (Abb. 4-10).

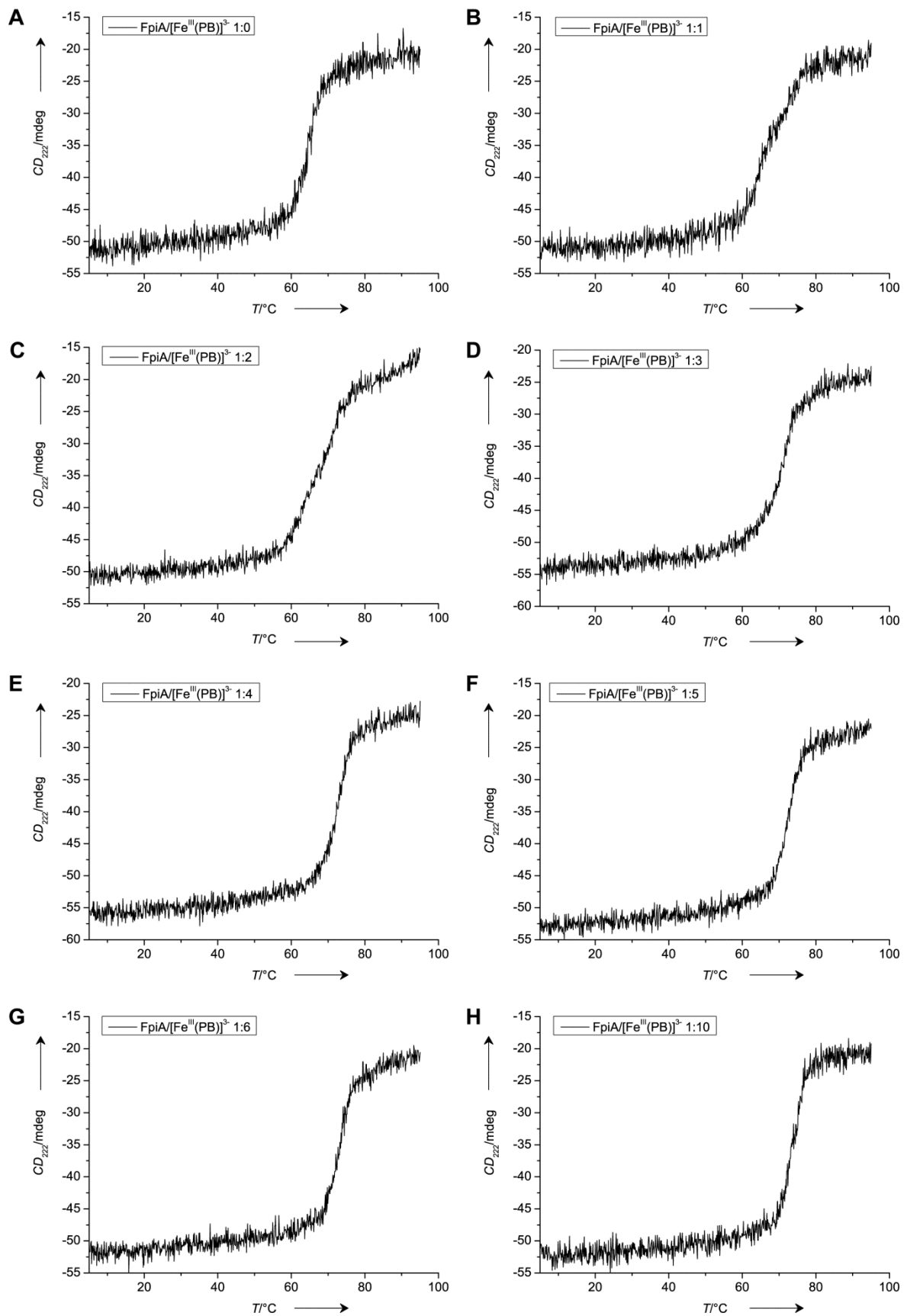


Abbildung 4-9: Repräsentative Schmelzkurven von FpiA mit steigenden Konzentrationen von $[Fe^{III}(PB)]^{3-}$.

A) 1:0. B) 1:1. C) 1:2. D) 1:3. E) 1:4. F) 1:5. G) 1:6. H) 1:10. CD_{222} : CD-Signal bei 222 nm, T : Temperatur.

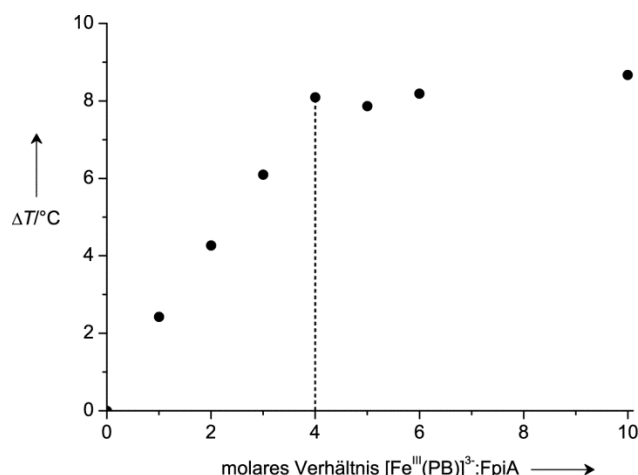


Abbildung 4-10: Schmelzpunkte von FpiA in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ zu FpiA.

ΔT : Temperaturdifferenz.

Ligandenkonfiguration

Siderophore können abhängig von der Stereokonfiguration ihres Metallzentrums unterschiedliche CD-Spektren aufweisen. Diese Stereokonfiguration kann sich auch erst bei Bindung durch das Protein einstellen oder nach Proteinbindung in die jeweils inverse Konfiguration umkehren. Daher wurden CD-Spektren der Liganden $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ in An- und Abwesenheit von FpiA im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums aufgenommen (Abb. 4-11). Es zeigte sich, dass beide Liganden erst in Anwesenheit von FpiA eine spezifische Stereokonfiguration am Metallzentrum ausbilden.

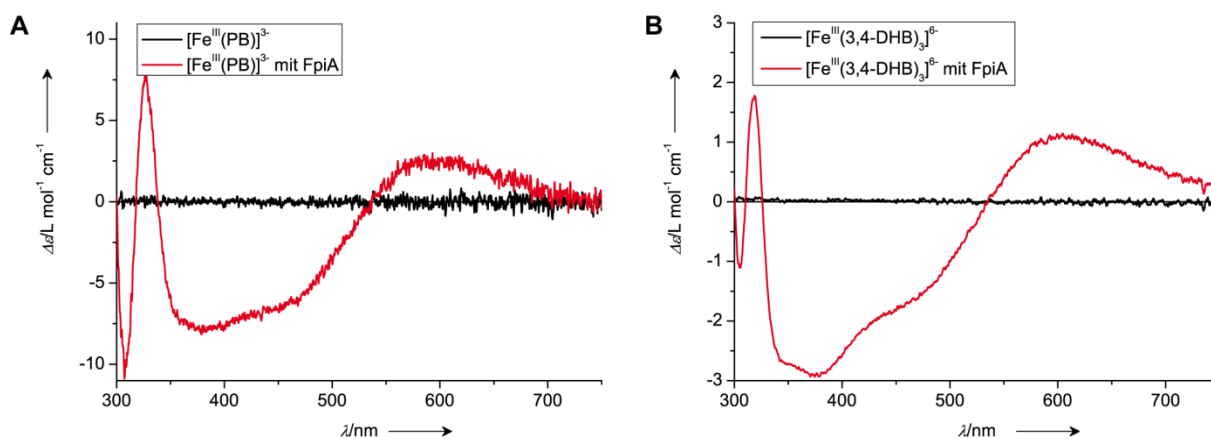


Abbildung 4-11: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ in An- und Abwesenheit von FpiA.

A) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$. $\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

4.1.4.4 Massenspektrometrie

Zur weiteren Untersuchung der ungewöhnlichen 1:4-Stöchiometrie von Protein/Ligand wurden massenspektrometrische Untersuchungen des Siderophors durchgeführt. Diese zeigten neben monomeren auch dimere und trimere Komplexe, etwa in einem Verhältnis von 2:3:1 (Abb. 4-12). Auffällig war, dass der trimere Komplex noch ein viertes Eisenion enthielt, ansonsten aber der Zusammensetzung eines Trimers entsprach

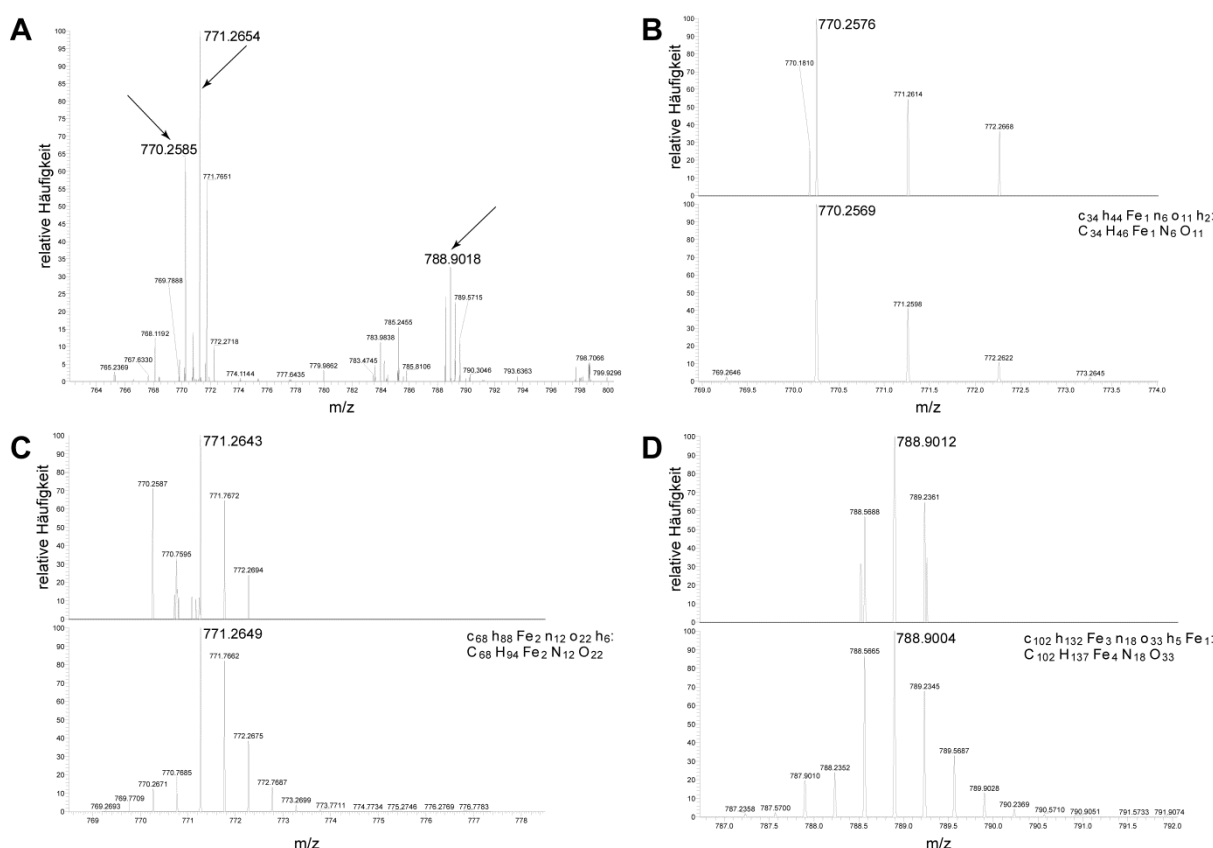


Abbildung 4-12: Massenspektrometrische Analyse von Eisen(III)-Petrobactin.

A) ESI-FT-MS-Spektrum von Eisen(III)-Petrobactin. B) Peaks des zweifach protonierten Monomers. Berechnet für $[C_{34}H_{44}Fe_1N_6O_{11}H_2]^+$: 770.2569, gefunden: 770.2576. C) Peaks des sechsfach protonierten Dimers. Berechnet für $[C_{68}H_{88}Fe_2N_{12}O_{22}H_6]^{2+}$: 771.2649, gefunden: 771.2643. D) Peaks des fünffach protonierten Trimers mit zusätzlichem Eisen. Berechnet für $[C_{102}H_{132}Fe_3N_{18}O_{33}H_5Fe_1]^{3+}$: 788.9004, gefunden: 788.9018. Die angegebenen Massen beziehen sich jeweils auf den intensivsten Isotopenpeak.

4.1.5 Kristallisationsansätze

Im Lauf dieser Untersuchungen wurde eine Kristallstruktur von *apo*-FpiA (YclQ) publiziert (PDB-Code: 3GFV).^[269] Eine hochreine, homogene FpiA-Lösung wurde unabhängig davon zu Kristallisationsexperimenten eingesetzt, wobei Kristalle von *apo*-FpiA in zahlreichen Bedingungen erhalten werden konnten (Abb. 4-13), selbst wenn die mit hoher Affinität gebundenen Substrate $[Fe^{III}(PB)]^{3-}$ oder $[Fe^{III}(3,4-DHB)_3]^{6-}$ zugegen waren. Cokristalle mit diesen beiden Substraten konnten aller Anstrengungen zum Trotz nicht erhalten werden.

Die erhaltenen Kristalle wurden auf ihre Diffraktionsfähigkeit getestet und von den zur höchsten Auflösung streuenden Kristallen wurden Datensätze aufgenommen. Die in Anwesenheit von $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ gewachsenen *apo*-Kristalle kristallisierten in der bereits bekannten Raumgruppe $P2_1$ mit zwei Proteinen in der asymmetrischen Einheit. Daneben wurden Kristalle in der Raumgruppe $P1$ mit vier Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit

erhalten. Da alle Kristalle jedoch nur bis zu einer deutlich geringeren Auflösung diffraktierten als die bereits publizierte Struktur, keine Differenzelektronendichte auf Ligandenbindung hindeutete und keine konformationellen Veränderungen des Proteins erkennbar waren, wurde auf eine Verfeinerung dieser Strukturen verzichtet. Die Kristallisationsbedingungen der vermessenen Kristalle sind in Tab. 4-7 und die erhaltenen kristallographischen Parameter in Tab. 4-8 angegeben.

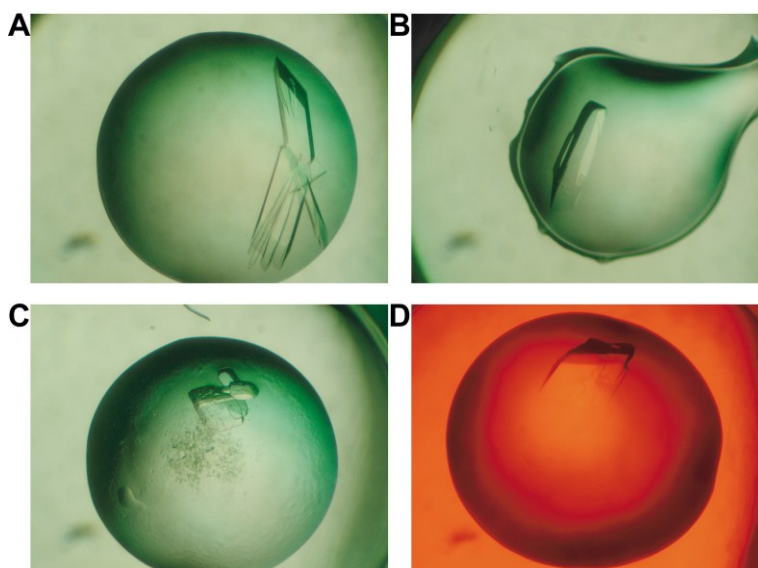


Abbildung 4-13: FpiA-Kristalle.

A) bis C) Kristalle von *apo*-FpiA in verschiedenen Bedingungen. D) Kristall aus einem Cokristallisationsansatz mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$, der unter Rotlicht (629 nm) fotografiert wurde.

Tabelle 4-7: Kristallisationsbedingungen von FpiA.

Proteinkomplex	Kristallisationslösung	Proteinkonzentration
$\text{FpiA} \cdot 4[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 4.2, 40% (v/v) PEG 300	40.0 mg mL ⁻¹
$\text{FpiA} \cdot 4[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 5.00, 45% (v/v) PEG 300	40.0 mg mL ⁻¹
$\text{FpiA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 5.00, 40% (v/v) PEG 300	40.0 mg mL ⁻¹

Die Kristallisationsansätze wurden erschütterungsfrei bei einer konstanten Temperatur von 18 °C inkubiert.

Tabelle 4-8: Kristallographische Tabelle der vermessenen FpiA-Kristalle.

Datensammlung	<i>apo</i> -FpiA	<i>apo</i> -FpiA
Kristall	FP146	FP208
Solvensgehalt (%)	37.9	41.7
Röntgenquelle	ID14-2, ESRF	ID23-1, ESRF
Wellenlänge (Å)	0.93300	0.93925
Detektor	ADSC Q315R	225 mm MarMOSAIC
Raumgruppe	<i>P</i> 1	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	36.00, 67.57, 112.07	82.89, 36.28, 95.01
α , β , γ (°)	100.03, 92.47, 88.31	90.00, 90.57, 90.00
Auflösung (Å)	46.60-2.65	47.46-2.68
Beobachtete Reflexe ^[a]	116407 (17094)	58143 (7374)
Einzigartige Reflexe ^[a]	29573 (4327)	16283 (2291)
Vollständigkeit (%) ^[a]	97.9 (97.1)	99.4 (97.6)
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ ^[a]	18.3 (2.0)	24.2 (2.1)
R_{merge} ^[a,b]	0.070 (0.711)	0.035 (0.565)
Mosaizität (°)	0.25	0.17
Wilson <i>B</i> -Faktor (Å ²)	62.8	80.2

[a] Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[b] $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$

Da auch in den Cokristallisationsansätzen nur *apo*-Kristalle erhalten werden konnten, wurden *soaking*-Experimente der FpiA-Kristalle mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ durchgeführt, die allerdings ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg führten. Teilweise lösten sich die Kristalle bereits nach einer Inkubationszeit von < 1 min auf. Ein weiteres Problem stellte der pH-Wert der Kristallisationslösung (in der Regel < 7.0) dar, da $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ unter diesen Bedingungen ausfiel. Eine vorherige Transferierung der Kristalle in entsprechende Kristallisationslösungen mit denselben Präzipitankonzentrationen aber höherem pH-Wert vermochte dieses Problem nicht zu lösen.

4.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des Triscatecholat-Bindungsproteins FeuA

Ein *feuA*-Konstrukt aus *B. subtilis* ATCC 21332 mit C-terminalem His₆-Tag unter T7-Promotorkontrolle wurde von Oliver Klotz kloniert^[191,194] und für alle weiteren Arbeiten verwendet. Es handelt sich hierbei um das Substratbindungsprotein des ABC-Transporters FeuABC–YusV₂, der für den Import der eisenbeladenen Siderophore Bacillibactin und Enterobactin zuständig ist (Abb. 4-14).^[185,191] Im nativen System ist FeuA über eine Lipidmodifikation in der Cytoplasmamembran verankert. Das vorausgesagte Signalpeptid inklusiv des Lipidanker-bindenden Cys-Restes wurde bei der Klonierung

allerdings nicht berücksichtigt. Das rekombinante Protein hat ein Molekulargewicht von 34.75 kDa und sein pI-Wert liegt bei etwa 7.2.

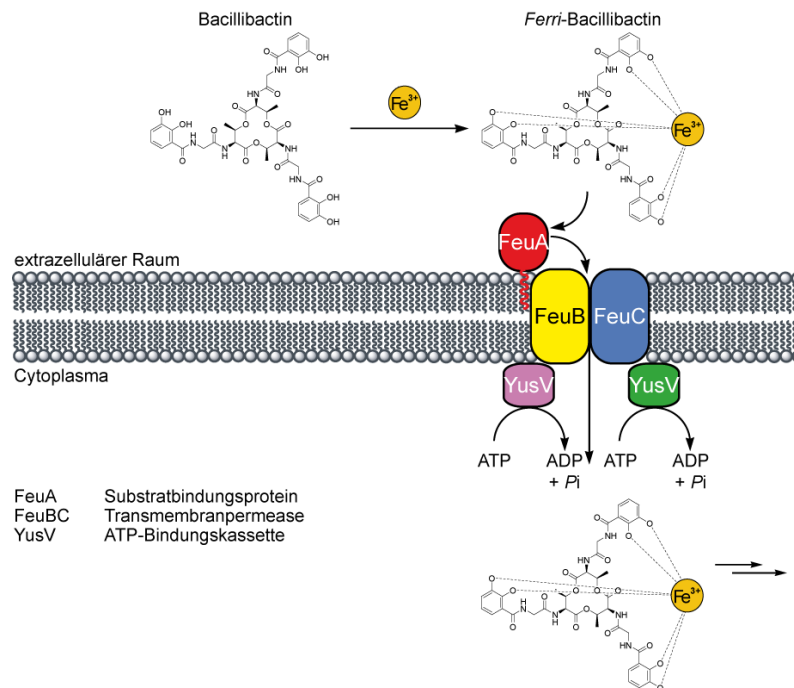


Abbildung 4-14: Schematische Darstellung des ABC-Transporters FeuABC-YusV₂.

4.2.1 Expression, Reinigung und Kristallisation

Die Expression erfolgte unter Standardbedingungen und die nachfolgende Reinigung mittels Ni²⁺-NTA- und Größenausschlusschromatographie ergaben homogenes FeuA-His₆-Fusionsprotein (Abb. 4-15) in sehr guten Ausbeuten (> 20 mg Protein/L Kultur). Für Cokristallisationsansätze wurde nach der Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Chromatographie ein zweifacher molarer Überschuss des jeweiligen Liganden zur Proteinlösung gegeben und etwa 15 min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung des Ligandenüberschusses erfolgte mittels SEC. Die so erhaltenen homogenen Protein-Ligand-Komplexe wurden dann für die Cokristallisation verwendet.

Die besten Kristalle von apo-FeuA wurden mit der *sitting drop*-Dampfdiffusionsmethode direkt aus den ersten *sparse matrix*-Screens erhalten (JCSG+, Lösung Nr. 73). Das Tropfenvolumen betrug dabei 600 nL, die Proteinkonzentration 8.7 mg mL⁻¹ und die Temperatur 18 °C.

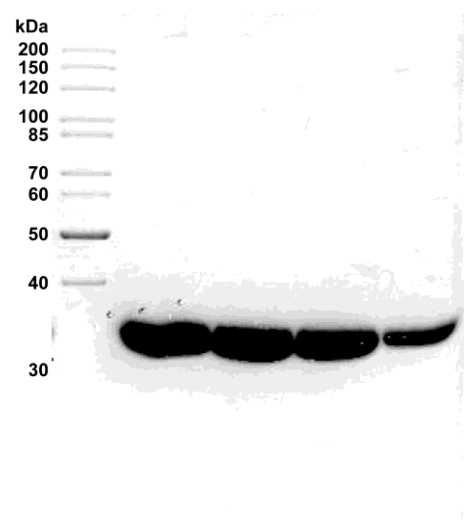


Abbildung 4-15: SDS-PAGE mehrerer SEC-Fractionen von rekombinantem FeuA.

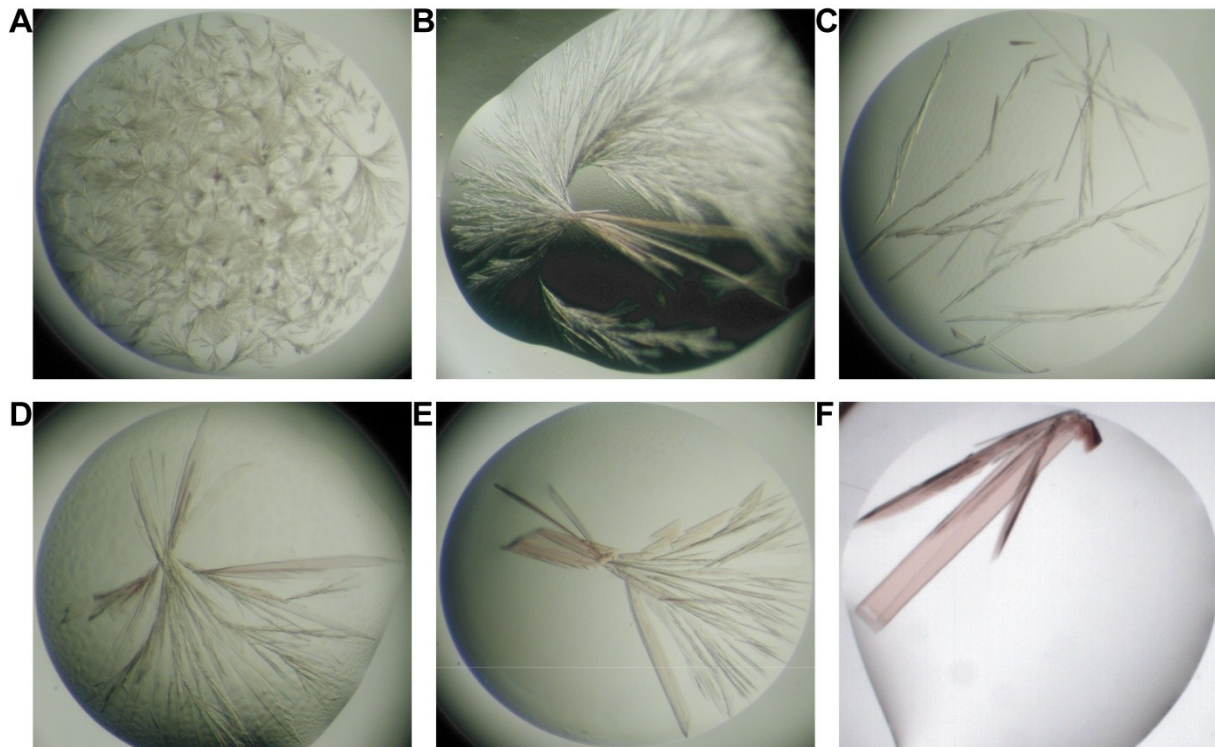


Abbildung 4-16: Optimierung der FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Kristalle.

A) Erste Nadeln. B) Nadeln von einem einzigen Nukleationskeim ausgehend. C) Vereinzelte Nadeln. D) Nadeln und erste Blättchen. E) Größere Blättchen. F) Dreidimensionale Einkristalle.

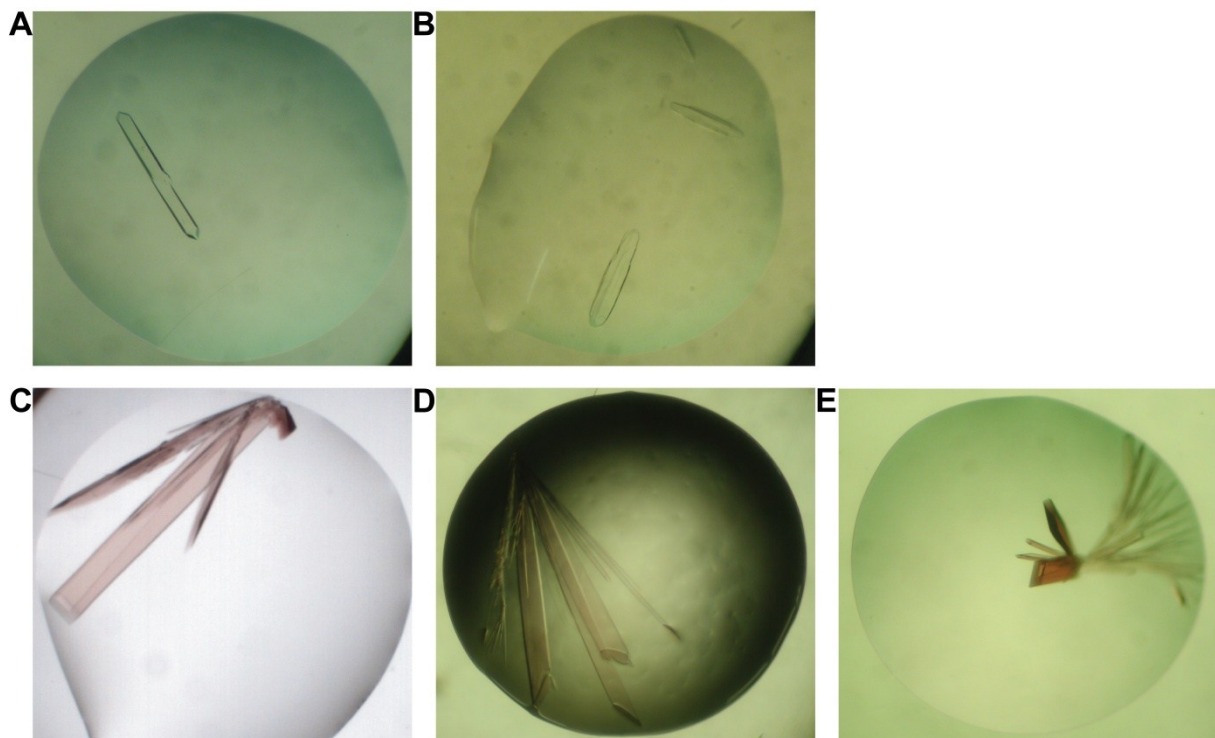


Abbildung 4-17: FeuA-Kristalle.

A) *apo*-FeuA, Kristallform I. B) *apo*-FeuA, Kristallform II. C) FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻. D) FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻. E) FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻.

Die Kristalle wuchsen innerhalb von 24 h und diffraktierten am Synchrotron bis zu einer Auflösung von 1.55 Å. Weitere Kristalle von *apo*-FeuA wuchsen ebenfalls in Screenbedingungen, diese diffraktierten jedoch nur bis zu einer Auflösung von etwa 3.10 Å und die Qualität der Kristalle konnte trotz intensiver Bemühungen nicht weiter optimiert werden. Kristalle der FeuA-Komplexe mit den Siderophorkomplexanionen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$, die zu hoher Auflösung diffraktierten, konnten nach intensiver Optimierung der Kristallisationsbedingungen erhalten werden (Abb. 4-16). Dabei wurde neben dem pH-Wert insbesondere die Art und Konzentration des Präzipitans PEG variiert. Diese Kristalle wurden alle in ähnlichen Kristallisationslösungen erhalten und wuchsen in einem Zeitraum von zwei Tagen bis zwei Wochen.

Tabelle 4-9: Kristallisationsbedingungen der FeuA-Kristalle.

Proteinkomplex	Kristallisationslösung	Proteinkonzentration
<i>apo</i> -FeuA	0.1 mol L ⁻¹ HEPES pH 7.0	7.8 mg mL ⁻¹
	30% (v/v) Jeffamine ED-2001 pH 7.0	
<i>apo</i> -FeuA	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 4.2	7.8 mg mL ⁻¹
	40% (v/v) PEG 300	
FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 5.2	40.0 mg mL ⁻¹
	30% (v/v) PEG 600	
FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 5.2	40.0 mg mL ⁻¹
	34% (v/v) PEG 600	
FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$	0.1 mol L ⁻¹ Phosphat-Citrat pH 5.0	40.0 mg mL ⁻¹
	45% (v/v) PEG 300	

Die Kristallisationsansätze wurden erschütterungsfrei bei einer konstanten Temperatur von 18 °C inkubiert.

Die Tropfenvolumina betrugen 1 µL, die Proteinkonzentrationen 40.0 mg mL⁻¹ und die Temperatur 18 °C. Anzumerken bleibt, dass die Qualität der so erhaltenen Kristalle nicht einheitlich war. Pro FeuA-Siderophor-Komplex mussten etwa 20 Kristalle getestet werden, um die Kristalle mit den angegebenen hohen Auflösungen zu finden. Typische Kristalle sind in Abb. 4-17 gezeigt und die Kristallisationsbedingungen für alle Kristalle sind in Tab. 4-9 angegeben.

4.2.2 Datensammlung, Strukturlösung und -verfeinerung

Die erhaltenen Kristalle wurden mit Glycerin-haltigem Cryopuffer behandelt und erst dann in N₂(l) schockgefroren, soweit keine ausreichend hohe Konzentration von niedermolekularem PEG in den Kristallisationslösungen vorhanden war. Hochauflösende Datensätze der Kristalle wurden im Kaltstickstoffstrom (100 K) an Beamlines der ESRF in Grenoble, Frankreich aufgenommen (Abb. 4-18). Die so erhaltenen Diffraktionsbilder der Kristalle wurden mit dem Programm XDS^[234] indiziert und prozessiert, die anschließende Datenreduktion erfolgte mit XSCALE.^[234] Die hochauflösenden Kristalle von *apo*-FeuA gehörten zur Raumgruppe *P*₄₁₂₁₂ und entsprachen mit ihren dazugehörigen Zellparametern der bereits bekannten Kristallform von FeuA (PDB-Code: 2PHZ).

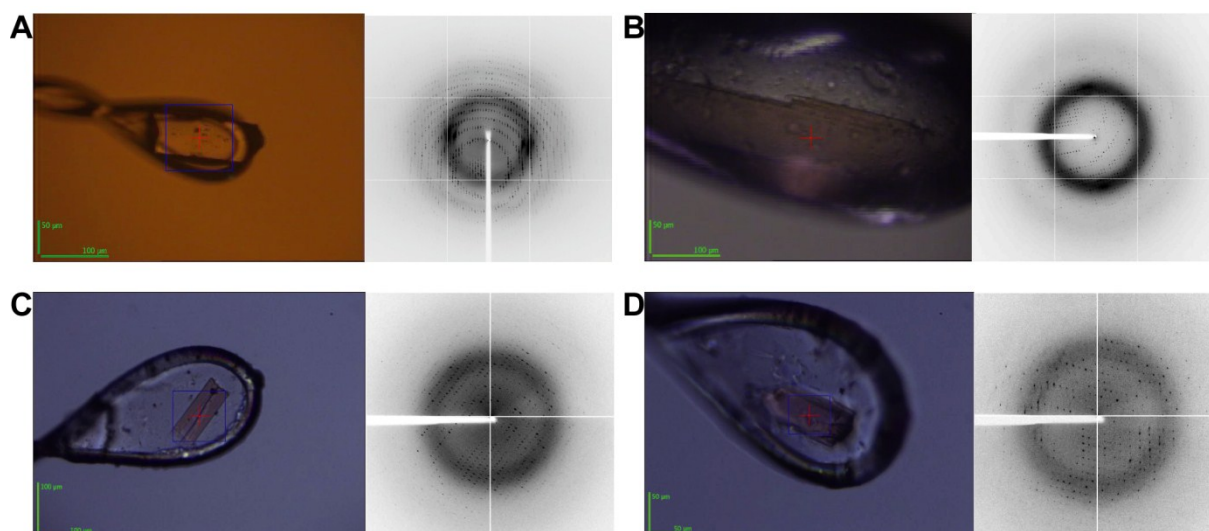


Abbildung 4-18: Am Synchrotron vermessene FeuA-Kristalle.

A) *apo*-FeuA. B) FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻. C) FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻. D) FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻. Links ist jeweils der in einer Nylonschleife montierte Kristall gezeigt, rechts ein beispielhaftes Diffraktionsbild.

Die niederaufgelösten *apo*-FeuA-Kristalle gehörten zur Raumgruppe *I*222 und stellten somit eine neue Kristallform dar. Die Cokristalle von FeuA mit [Fe^{III}(BB)]³⁻, [Fe^{III}(Ent)]³⁻ und [Fe^{III}(mecam)]³⁻ streuten bis zu hoher oder mittlerer Auflösung und konnten alle der Raumgruppe *P*2₁ zugeordnet werden (Tab. 4-10). Die Strukturlösung der *apo*-Kristalle und des FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Komplexes erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (FB Chemie, Philipps-Universität Marburg).

Tabelle 4-10: Parameter vermessener FeuA-Kristalle.

Proteinkomplex	Kristall	Solvensgehalt	Auflösung	Raumgruppe
<i>apo</i> -FeuA	FP003	35.9%	1.55 Å	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2
<i>apo</i> -FeuA	FP050	60.9%	3.10 Å	<i>I</i> 222
FeuA·[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	FP103	33.7%	1.70 Å	<i>P</i> 12 ₁ 1
FeuA·[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	FP181	33.7%	1.90 Å	<i>P</i> 12 ₁ 1
FeuA·[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻	FP160	36.2%	2.15 Å	<i>P</i> 12 ₁ 1

Die Strukturlösung für den niederaufgelösten Datensatz von *apo*-FeuA und FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻ erfolgte mit der Methode des molekularen Ersatzes mit dem PHASER-Programm^[235,238] mit der bereits bekannten FeuA-Struktur als Suchmodell (PDB-Code: 2PHZ) und die von FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻ und FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻ mit der FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Struktur als Suchmodell (PDB-Code: 2WHY). Als Modell für die Strukturlösung der bekannten *apo*-FeuA-Kristallform diente die bereits in der PDB hinterlegte FeuA-Struktur (PDB-Code: 2PHZ), die direkt im Programm REFMAC5^[235,241] zur Verfeinerung der Struktur verwendet wurde, wobei die Annahme zu Grunde gelegt wird, dass die Kristallpackung bei gleicher Raumgruppe und gleichen Zellparametern identisch sei.

Für die Lösung des $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplexes musste das Suchmodell in drei Ensembles unterteilt werden, die die *N*- und *C*-terminale Domäne bzw. die Rückgrat- α -Helix enthielten. Eine direkte Verfeinerung der $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ - und $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexe war nicht möglich (vermutlich aufgrund der leicht geänderten Zellparameter), eine Phasenbestimmung mit dem PHASER-Programm erbrachte jedoch eindeutige Lösungen. Die erhaltenen Strukturmodelle wurden anschließend mit den Programmen REFMAC5^[235,241] und Coot^[239-240] manuell modifiziert und verfeinert.

Tabelle 4-11: Kristallographische Tabelle der nativen FeuA-Kristalle.

Datensammlung	native Kristallform I	native Kristallform II
PDB-Code	2WI8	–
Röntgenquelle	ID29, ESRF	ID14-4, ESRF
Wellenlänge (Å)	0.97623	0.93300
Detektor	ADSC Q315R	ADSC Q315r CCD
Raumgruppe	$P4_12_12$	$I222$
a, b, c (Å)	54.71, 54.71, 177.66	74.81, 141.30, 242.85
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Auflösung (Å)	19.23-1.55	46.24-3.02
Beobachtete Reflexe ^[a]	184567 (25775)	162764 (23844)
Einzigartige Reflexe ^[a]	39175 (5445)	25752 (3687)
Vollständigkeit (%) ^[a]	98.1 (95.9)	99.9 (100.0)
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ ^[a]	17.5 (4.8)	6.6 (2.0)
R_{merge} ^[a,b]	0.056 (0.372)	0.173 (0.711)
Mosaizität (°)	0.44	0.84
Wilson <i>B</i> -Faktor (Å ²)	16.6	91.4
Verfeinerung		
$R_{\text{work}}, R_{\text{free}}$ ^[c,d]	18.2, 21.5	–
Verwendete Reflexe	38175	–
Mittlerer <i>B</i> -Faktor (Å ²)	20.3	–
Anzahl der Atome	2489	–
<i>rmsd vom Ideal:</i>		
Bindungslängen (Å)	0.012	–
Bindungswinkel (°)	1.349	–
[a] Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.		
[b] $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$		
[c] $R_{\text{work}} = \sum (F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}}) / \sum (F_{\text{gef.}})$		
[d] R_{free} : Kristallographischer R-Faktor basierend auf 2.6% (native Kristallform I) der Daten, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.		

Tabelle 4-12: Kristallographische Tabelle der FeuA–Siderophor-Kristalle.

Datensammlung	FeuA·[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	FeuA·[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	FeuA·[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻
PDB-Code	2WHY	2XUZ	2XV1
Röntgenquelle	ID29, ESRF	ID14-2, ESRF	ID14-2, ESRF
Wellenlänge (Å)	0.91840	0.93300	0.93300
Detektor	ADSC Q315R	ADSC Q4 CCD	ADSC Q4 CCD
Raumgruppe	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	39.53, 63.14, 55.53	36.44, 63.56, 56.52	39.96, 63.44, 56.21
β (°)	110.44	100.65	110.27
Auflösung (Å)	19.76-1.70	41.83-1.90	40.55-2.15
Beobachtete Reflexe ^[a]	102354 (15162)	61441 (8791)	41311 (6091)
Einzigartige Reflexe ^[a]	28022 (4113)	19907 (2852)	13962 (2074)
Vollständigkeit (%) ^[a]	99.2 (99.5)	99.1 (97.7)	96.9 (98.3)
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ ^[a]	20.1 (3.4)	14.8 (2.5)	18.4 (2.2)
<i>R</i> _{merge} ^[a,b]	0.042 (0.520)	0.058 (0.493)	0.046 (0.595)
Mosaizität (°)	0.33	0.52	0.25
Wilson <i>B</i> -Faktor (Å ²)	24.4	21.4	39.1
Verfeinerung			
<i>R</i> _{work} , <i>R</i> _{free} ^[c,d]	15.7, 19.1	18.5, 24.3	17.8, 23.7
Verwendete Reflexe	25537	18136	12740
Mittlerer <i>B</i> -Faktor (Å ²)	23.3	22.4	38.3
Anzahl der Atome	2403	2430	2314
<i>rmsd vom Ideal:</i>			
Bindungslängen (Å)	0.009	0.009	0.008
Bindungswinkel (°)	1.159	1.213	1.142

[a] Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[b] $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$

[c] $R_{\text{work}} = \sum (F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}}) / \sum (F_{\text{gef.}})$

[d] *R*_{free}: Kristallographischer R-Faktor basierend auf 8.8% (FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻), 5.0% (FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻) bzw. 7.2% (FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻) der Daten, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.

Dabei wurden stets zunächst die Haupt- und Seitenketten des Proteins verfeinert und anschließend Liganden und Wassermoleküle in die Elektronendichte eingepasst. Stereochemische Bibliothekseinträge der Liganden wurden wie folgt erhalten: BB wurde aus drei Einheiten Threonin, drei Einheiten Glycin sowie drei Einheiten 2,3-DHB (Daten vom Hetero-compound Information Centre Uppsala (HIC-Up)) zusammengesetzt.^[253-255] Die Ent-Bibliothek wurde durch den PRODRG2.5-Server (beta) berechnet.^[259] Dabei wurden die Koordinaten des [Ga^{III}(Ent)]³⁻-Komplexes (ohne Metallion) aus der NMR-Struktur des Lipocalins Q83·[Ga^{III}(Ent)]³⁻-Komplexes (PDB-Code: 2KT4, Bezeichnung: eb4)^[67] als Ausgangsbasis verwendet. Die Bibliothek für mecam wurde direkt aus der HIC-Up-Datenbank erhalten (Bezeichnung: eca). Anhand der so erhaltenen stereochemischen

Parameter und Koordinaten wurden die Metall-Siderophor-Komplexe in die Elektronendichte eingebaut und die Verfeinerung fortgeführt. Die Tab. 4-11 und 4-12 enthalten die Statistiken für Datensammlung und Verfeinerung der vermessenen Kristalle. Allen bis zu hoher Auflösung streuenden Kristallen waren ein niedriger Solvensgehalt und eine enge Kristallpackung gemein.

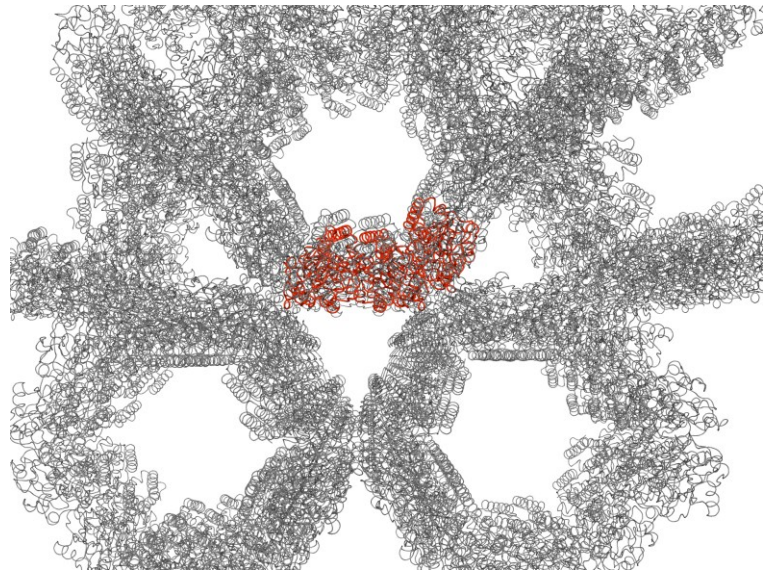


Abbildung 4-19: Kristallgitter der Kristallform II von *apo-FeuA*.

Die drei Moleküle der ursprünglichen asymmetrischen Einheit sind rot dargestellt.

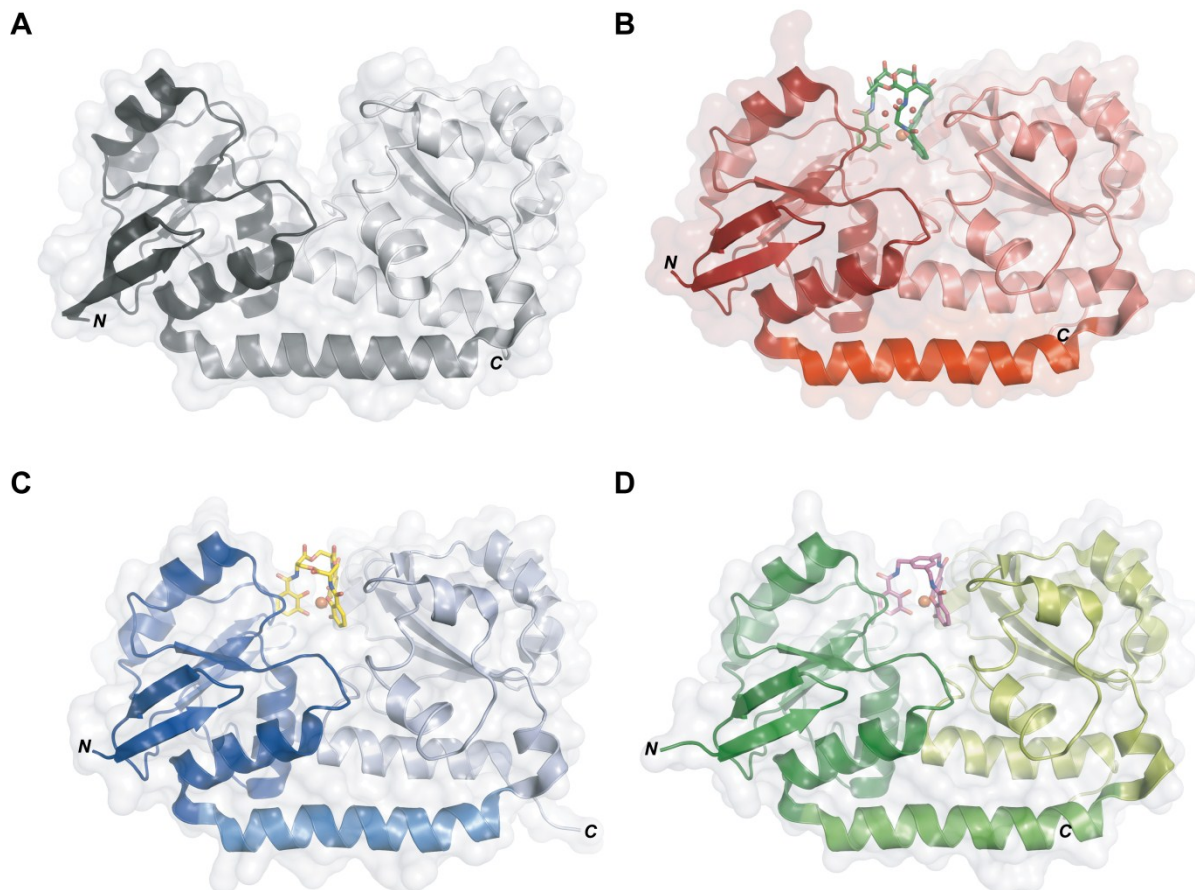


Abbildung 4-20: Strukturgalerie der in dieser Arbeit gelösten Proteinkomplexe.

A) *apo-FeuA*. B) *FeuA*·[Fe^{III}(BB)]³⁻. C) *FeuA*·[Fe^{III}(Ent)]³⁻. D) *FeuA*·[Fe^{III}(mecam)]³⁻. Die *N*- und *C*-terminale Domäne sowie die verbindende α -Helix sind in jeweils unterschiedlichen Farbschattierungen gezeigt.

Der zweite erhaltene *apo*-FeuA-Kristall hingegen wies einen sehr hohen Solvensgehalt von fast 61% auf. Nach Strukturlösung zeigten sich entsprechend riesige Kanäle im Kristallgitter (Abb. 4-19). Diese röhrenartige Struktur erklärt sowohl den hohen Solvensgehalt als auch die längliche Morphologie der Kristalle. Da die Auflösung der nativen Kristallform II jedoch deutlich geringer als die der nativen Kristallform I war und keine signifikanten Domänenbewegungen in dieser Kristallform zu beobachten waren, wurde auf eine weitere Verfeinerung der Struktur verzichtet.

Die vier Strukturen, die in der PDB deponiert wurden sind in Abb. 4-20 gezeigt. Dabei wurde eine Farbzuzuordnung angewandt, die in dieser Arbeit, soweit nicht anders angegeben, durchgängig Verwendung finden soll: Grau steht für *apo*-FeuA, rot für $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, blau für $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und grün für $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$. Gleiches gilt für die Farbzuzuordnung der Kohlenstoffatome der Liganden: Dunkelgrün für BB, gelb für Ent und violett für mecam.

4.2.3 Gesamtproteinstruktur

FeuA besteht aus zwei unabhängigen, nicht-symmetrischen, globulären Domänen, dabei umfasst die *N*-terminale Domäne die Reste 1-142 und die *C*-terminale Domäne die Reste 165-312. Die zwei Domänen sind durch eine lange Rückgrat- α -Helix miteinander verbunden, die durch die Reste 143-164 gebildet wird. Die Siderophorbindungsstelle wird zwischen den beiden Domänen an ihrer Berührungsfläche gebildet. Während keinerlei detektierbare Sequenzhomologie zwischen beiden Domänen existiert, ist ihr generelles Faltungsmotiv sehr ähnlich, sie weisen beiden eine Rossmann-ähnliche Faltung auf. Der Kern der *N*-terminalen Domäne besteht aus einem dreisträngigen, parallelen β -Faltblatt, das von zahlreichen α -Helices und einem zweisträngigen, antiparallelen β -Faltblatt umgeben wird. Der Kern der *C*-terminalen Domäne ist ebenfalls aus einem gemischten viersträngigen β -Faltblatt aufgebaut (davon drei parallele Stränge), das wiederum von zahlreichen α -Helices flankiert wird. Der Verlauf der β -Faltblätter ist dabei $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ für den Kern der *N*-terminalen Domäne und $\beta 2$ - $\beta 1$ - $\beta 3$ - $\beta 4$ für den Kern der *C*-terminalen Domäne.

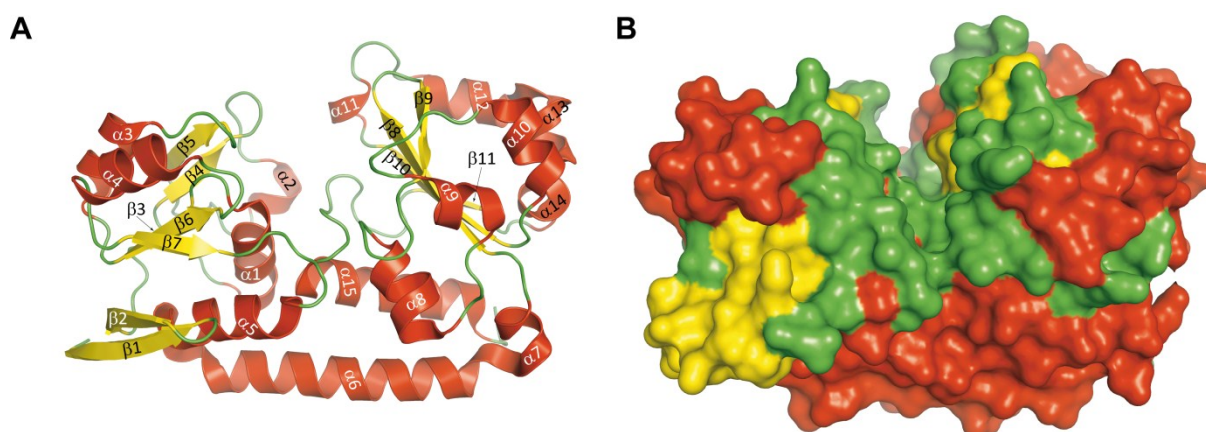


Abbildung 4-21: Sekundärstrukturelemente und Oberfläche von FeuA.

A) Darstellung mit Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente. B) Oberflächendarstellung. α -Helices sind rot, β -Faltblätter gelb und Loops grün dargestellt.

Die Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente ist in Abb. 4-21 dargestellt und Tab. 4-13 zeigt eine Liste der Sekundärstrukturelemente für die in dieser Arbeit gelösten Strukturen.

Tabelle 4-13: Sekundärstrukturelemente der FeuA-Komplexe.

Sekundärstruktur- Element	<i>apo</i> -FeuA	FeuA·[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	FeuA·[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	FeuA·[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻
ungeordnet	1-16	1-18	1-18	1-17
β1	18-24	20-24	20-24	20-24
β2	27-33	27-31	27-31	27-31
β3	38-40	38-40	38-40	38-40
α1	43-54	43-54	43-54	43-54
β4	59-62	59-62	59-62	59-62
α2	68-72	68-72	68-72	68-72
β5	79-83	79-83	79-83	79-83
α3	88-96	88-96	88-96	88-96
β6	99-103	99-103	99-103	99-103
α4	107-116	107-115	107-115	107-115
β7	120-123	120-123	120-123	120-123
α5	129-142	129-142	129-142	129-142
α6	143-165	143-165	143-165	143-165
α7	166-171	166-171	166-171	166-171
β8	174-180	174-180	174-180	174-180
β9	183-186	183-186	183-186	183-186
α8	193-202	193-198	193-198	193-198
α9	206-212	206-211	206-212	206-212
β9'	–	–	216-217	216-217
α10	219-227	219-227	219-227	219-227
β10	230-235	230-235	230-235	230-235
α11	237-240	237-241	237-241	237-241
α12	245-253	245-253	245-252	245-253
α13	253-258	255-258	253-258	254-258
α14	259-264	259-265	259-264	259-264
β11	267-269	267-269	267-269	267-269
α15	280-296	280-297	280-296	280-296
ungeordnet	297-312	298-312	297-312	297-312

Die Oberfläche des Proteins wird im Wesentlichen von den α-Helices ausgebildet, während die β-Faltblätter im Kern der Domänen verborgen sind. Die Oberfläche der Bindungsspalte wird hauptsächlich von langen Loops gebildet, die die α-Helices und β-Faltblätter der jeweiligen Domäne

miteinander verbinden und weiterhin Interaktionen mit AS der jeweils anderen Domäne eingehen). Die verbrückende Helix α_6 zwischen beiden Domänen verläuft in ihrer Längsrichtung etwa vom Zentrum der einen Domäne zum Zentrum der anderen. Dabei liegen die Helices α_5 und α_{15} von der *N*- bzw. *C*-terminalen Domäne seitlich versetzt annähernd parallel zur Rückgrat- α -Helix. Die drei Helices bilden so eine stabile Substruktur des Proteins (Abb. 4-21).

Eine Voraussage von ungeordneten Regionen im Protein mit dem DISOPRED2-Server^[251-252] ergab, dass die Reste 1-21 des klonierten Konstrukts (bzw. Reste 1-21 des reifen Proteins) sowie die Reste 305-311 (ausschließlich Reste des Affinitätstags) ungeordnet sein sollten. In allen Strukturen waren diese Reste wie vorausgesagt weitestgehend ungeordnet und wiesen keine definierte Elektronendichte auf. Die AS-Reste 18-33 weisen viele hydrophile Reste auf und formen ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt, das in den *holo*-Strukturen etwas kürzer ist (AS-Reste 20-31). Dieses tritt in manchen Strukturen von Klasse III-Bindungsproteinen auf, jedoch längst nicht in allen. Es ist dem eigentlichen Kern der *N*-terminalen Domäne angelagert und schmiegt sich an deren Oberfläche (Abb. 4-22).

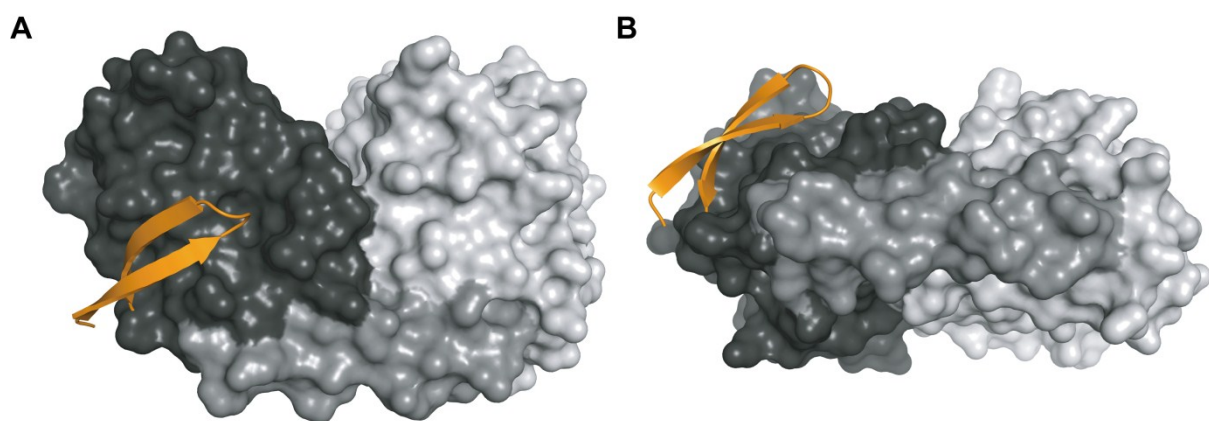


Abbildung 4-22: β -Faltblatt am *N*-Terminus von FeuA.

A) Seitliche Ansicht auf das β -Faltblatt. B) Blick von unten auf die das β -Faltblatt. Dieses ist in orange, die Oberflächen der *N*- und *C*-terminalen Domäne sowie der α -Helix in verschiedenen Grauschattierungen dargestellt.

Alle Strukturen sind als eher starr anzusehen und weisen in der Gesamtbetrachtung keine drastisch erhöhten B-Faktoren abgesehen von den Termini auf. Bereiche leicht erhöhter Flexibilität liegen bei den vier Strukturen insbesondere am Übergang zwischen Rückgrat-Helix (α_6) und *C*-terminaler Domäne, weiterhin in Helices an der Oberfläche, die beim Transportprozess in die Nähe der Cytoplasmamembran kommen würden. Teilweise unterscheiden sich die Regionen leicht erhöhter Flexibilität zwischen der *apo*- und den *holo*-Strukturen.

4.2.4 Domänenbewegung

Untypisch für ein Substratbindungsprotein der Klasse III zeigt FeuA starke konformationelle Veränderungen bei Bindung eines Substrats: Die *N*- und *C*-terminale Domäne rücken deutlich näher zusammen, wie dies für SBP der Klasse I oder II üblich ist. Wenn die *N*-terminalen Domänen der *apo*- und *holo*-Strukturen überlagert werden, lässt sich eine Verschiebung der *C*-terminalen Domäne von etwa 20° berechnen. Diese eigenen Berechnungen wurden durch den DynDom-Server bestätigt, welcher einen Rotationswinkel von 19.4° errechnete (allerdings bezogen auf die *N*-terminale Domäne, daher die geringen Abweichungen). Betrachtet man den Abstand zwischen den hoch konservierten Resten E90 und E221, die voraussichtlich für die Interaktion mit der Membranpermease FeuBC verantwortlich sind, so können *apo*- und *holo*-Struktur deutlich voneinander unterschieden werden. Die Differenz der Abstände zwischen den C_{α} -Atomen beider Reste zwischen *apo*- und *holo*-FeuA beträgt etwa 4 Å. Die genauen Abstände für alle Komplexe sind in Tab. 4-14 angegeben.

Tabelle 4-14: Vergleich der Abstände zwischen den konservierten Glu-Resten in FeuA und seinen Siderophorkomplexen.

Protein-Siderophor-Komplex	Abstand E90–E221 ^[a]	Abstand <i>apo</i> -/ <i>holo</i> -E221 ^[a,b]
<i>apo</i> -FeuA	48.5 Å	–
FeuA·[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	44.4 Å	11.3 Å
FeuA·[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	43.7 Å	11.4 Å
FeuA·[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻	44.5 Å	11.2 Å

[a] Die Abstände beziehen sich jeweils auf die C_{α} -Atome.

[b] Vorausgesetzt ist eine vorherige Überlagerung der *N*-terminalen Domänen.

Neben der bloßen Annäherung findet im Rahmen der Domänenbewegung weiterhin eine seitliche Verschiebung statt, so dass ein Winkel von etwa 13° zwischen den besagten Resten aufgespannt wird. Der Abstand zwischen den C_{α} -Atomen von *apo*- und *holo*-E221 beträgt dabei etwa 11.3 Å (jeweils bezogen auf vorherige Überlagerung der *N*-terminalen Domänen, siehe Abb. 4-23A).

Bei einer Überlagerung der Sekundärstrukturelemente von *apo*- und *holo*-Strukturen mit dem Programm Coot^[239] betrug die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*rmsd*) für FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻, FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻, bzw. FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻ 2.15 Å, 2.16 Å und 2.11 Å für je 272 AS-Reste (jeweils bezogen auf *apo*-FeuA). Bei einer Überlagerung der *holo*-Strukturen untereinander wurden *rmsd*-Werte von 0.38 Å für 278 C_{α} -Positionen von FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻ und 0.26 Å für 282 C_{α} -Positionen von FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻ gefunden, jeweils bezogen auf FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻ gefunden (Tab. 4-15, Abb. 4-23B).

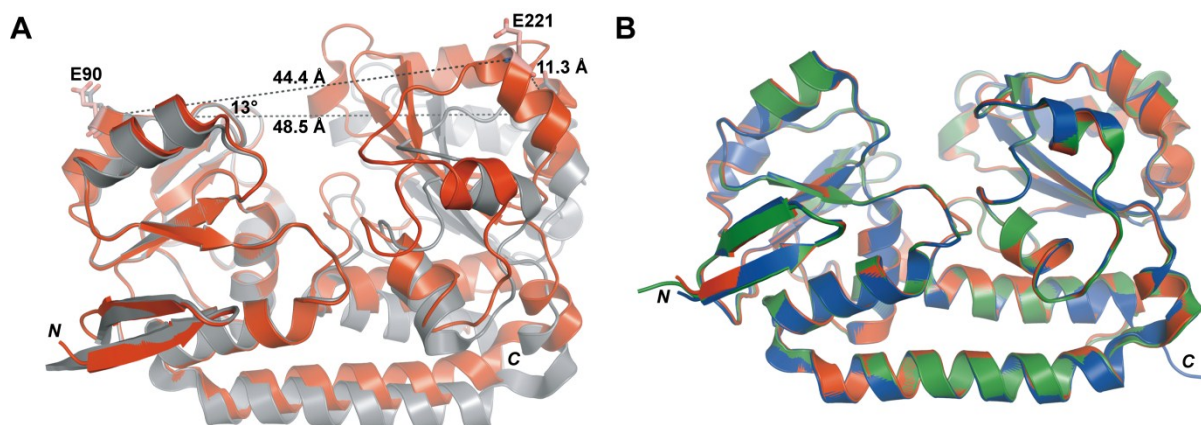


Abbildung 4-23: Überlagerung von *apo*- und *holo*-Strukturen von FeuA.

A) Überlagerung der *N*-terminalen Domäne von *apo*-FeuA (grau) und FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻ (rot). Eingezeichnet sind die jeweiligen Abstände zwischen E90 und E221. B) Überlagerung von FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻ (rot), FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻ (blau) und FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻ (grün).

Tabelle 4-15: Vergleich der *holo*-Strukturen hinsichtlich der Kippbewegung der Domänen und Abweichungen.

Protein–Siderophor-Komplex	Kippbewegung der Domänen gegenüber <i>apo</i> -Struktur	<i>rmsd</i> gegenüber <i>apo</i> -Struktur	<i>rmsd</i> gegenüber <i>holo</i> -Struktur ^[a]
FeuA·[Fe ^{III} (BB)] ³⁻	20.2°	2.15 Å	–
FeuA·[Fe ^{III} (Ent)] ³⁻	20.8°	2.16 Å	0.38 Å
FeuA·[Fe ^{III} (mecam)] ³⁻	20.4°	2.11 Å	0.26 Å

[a] Der *holo*-Vergleich bezieht sich auf FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻.

rmsd: Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung.

4.2.5 Bindungstasche

Die FeuA-Bindungstasche weist eine basische Triade auf, die von den AS-Resten K84 und K105 von der *N*-terminalen Domäne und R180 von der *C*-terminalen Domäne gebildet wird. Diese bindet die Liganden durch elektrostatische Wechselwirkungen, welche hauptsächlich gegen die *meta*-Catechol-Sauerstoffatome des jeweiligen Liganden gerichtet sind. Ein Rest der basischen Triade interkaliert stets zwischen zwei Catecholateinheiten, die Abstände zu den zwei *meta*-Sauerstoffatomen sind dabei jedoch nicht gleich (siehe auch Abb. 4-33, 4-35 und 4-37). Die Liganden sind durch die basische Triade fest gebunden. Diese ist selbst im Komplex äußerst starr und weist eine geringe konformationelle Flexibilität auf. Die Differenzelektronendichtekarten der Liganden und der basischen Triade aller Strukturen sind in Abb. 4-24 gezeigt. Die basische Triade von *apo*-FeuA besitzt im Gegensatz zu den Komplexen keine wohldefinierte Elektronendichte.

Um die Bedeutung der basischen Triade für die Ligandenbindung näher zu untersuchen, wurden Alaninvarianten der drei Reste mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt. Expression und Reinigung erfolgten analog zum nativen Protein. Weiterhin wurden die Reste R178 in der Bindungstasche und K213 auf der Oberfläche der *C*-terminalen Domäne einzeln zu Alanin mutiert. Die so erhaltenen FeuA-Varianten K84A, K105A und R180A sowie R178A und K213A wurden

fluoreszenzspektroskopisch auf ihre Fähigkeit zur Ligandenbindung untersucht (siehe Kapitel 4.2.6). Ausserdem wurde die Fähigkeit zur Stabilisierung der Proteinfaltung CD-spektroskopisch mittels ligandenabhängiger Schmelzpunktanalyse untersucht (siehe Kapitel 4.2.7).

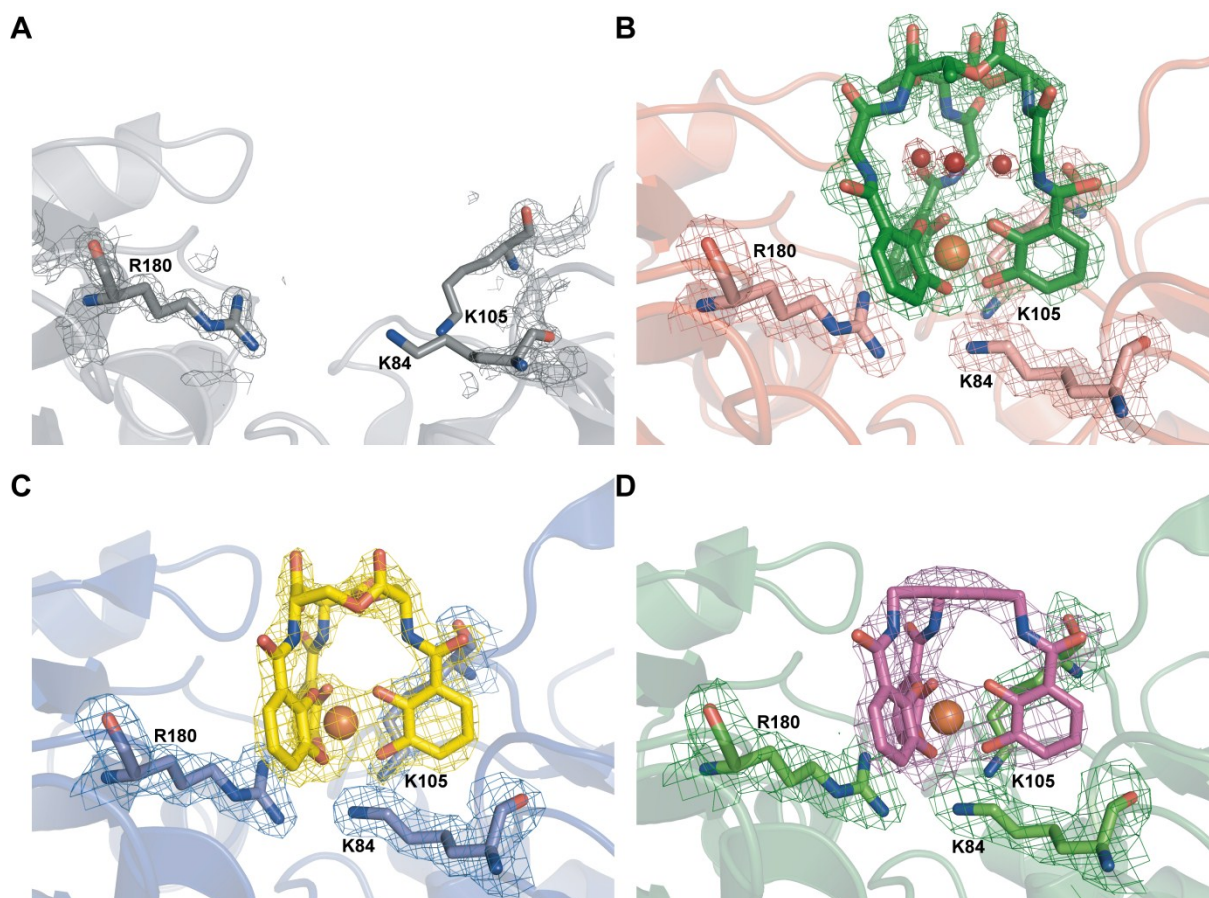


Abbildung 4-24: Differenzelektronendichte der basischen Triade und der Liganden.

A) apo-FeuA. B) $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. C) $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$. D) $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$. Gezeigt ist die $(2 F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}})$ -Elektronendichte (Konturierungsniveau 1σ) für die basische Triade und die SIGMAA-gewichtete $(F_{\text{gef.}} - F_{\text{ber.}})$ -Differenzelektronendichte für die Liganden (bei $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ auch für die drei Wassermoleküle (dunkelrote Kugeln)) mit einem Konturierungsniveau von 2.7σ .

Das Profil der Protein-Ligand-Wechselwirkung weist mit Q181 und Q215 nur zwei weitere Reste auf, die über Wasserstoffbrückenbindungen direkt mit dem jeweiligen Liganden interagieren. Das Amidproton der Seitenkette von Q181 interagiert mit der Carbonylfunktion einer Catechol-Einheit. Die Bindung von Q181 ist im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplex stark ausgeprägt, im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplex deutlich schwächer und im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplex gar nicht vorhanden.

Die N-H-Gruppe der Q215-Seitenkette zeigt ein wesentlich stärkeres Interaktionsprofil mit den Liganden und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit den *ortho*-Sauerstoffatomen von zwei Catecholateinheiten sowie der Amid-N-H-Gruppe zwischen der Catecholateinheit und dem jeweiligen Bindungspartner aus (abhängig vom Liganden). Ausserdem erfolgt eine Stabilisierung des Restes R180 über eine Wasserstoffbrückenbindung. Im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplex wird weiterhin eine

Bindung mit einem Wassermolekül gebildet, das wie in einem „Käfig“ zwischen Trilacton und Triscatecholat–Metall-Zentrum gefangen ist. In den $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ - und $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexen findet zudem eine Interaktion zwischen dem Amidproton des Polypeptidrückgrats und der Carbonylfunktion einer Catecholat-Gruppe statt.

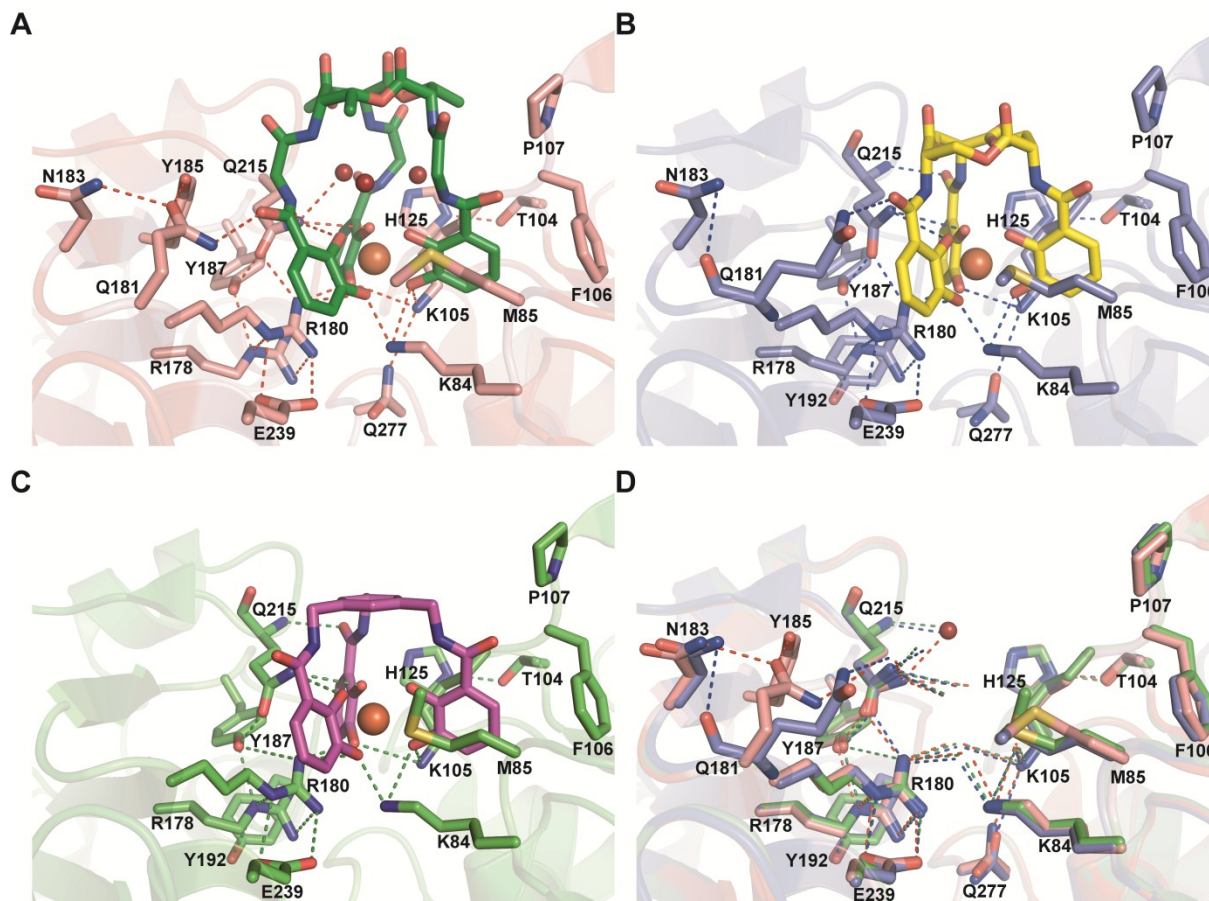


Abbildung 4-25: Interaktionsprofile zwischen Liganden und Aminosäureresten der Bindungstasche.

A) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$. C) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$. D) Überlagerung der Interaktionsprofile. Die Liganden wurden der Übersichtlichkeit halber hier nicht dargestellt.

Die Reste T104, H125, R178, N183, Y185, Y187, E239 und Q277 sind zwar an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt, weisen jedoch keine direkte Interaktion mit den Liganden auf. E239 wirkt mit einer zweizähnigen Interaktion als das elektrostatische Gegenlager zu R180.

Die Reste M85, F106 und P107 zeigen keinerlei Wechselwirkungen mit den Liganden oder anderen Resten der Bindungstasche, tragen jedoch zu deren Gesamtform bei. Genaue Interaktionsprofile der Liganden sind in Abb. 4-25 sowie in Tab. 4-16, 4-17 und 4-18 gezeigt.

Grundsätzlich weisen die an der Bindungstasche beteiligten Reste nur kleine Veränderungen auf, wenn $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ gebunden werden, welche als Substrate verwandt, aber dennoch verschieden zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ sind.

Tabelle 4-16: Interaktionen der in die $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Bindung involvierten FeuA-Reste.

AS-Rest	interagierende Gruppe	Interaktionspartner	Entfernung
K84	Amin	<i>meta-O</i> von DHB1	3.2 Å
	Amin	<i>meta-O</i> von DHB3	2.6 Å
K105	Amin	<i>meta-O</i> von DHB1	2.7 Å
	Amin	<i>meta-O</i> von DHB2	3.6 Å
R180	Guanidiniumgruppe	<i>meta-O</i> von DHB2	2.7 Å
	Guanidiniumgruppe	<i>meta-O</i> von DHB3	3.4 Å
Q181	Amid-N–H	C=O von DHB3	3.1 Å
Q215	Amid-N–H	Amid-N–H von Gly3	3.3 Å
	Amid-N–H	<i>ortho-O</i> von DHB2	3.2 Å
	Amid-N–H	<i>ortho-O</i> von DHB3	2.9 Å
	Amid-N–H	Wassermol. in $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	3.0 Å
	Amid-C=O	Guanidiniumgr. von R180	2.9 Å
T104	Hydroxylgruppe	Imidazolring von H125	2.7 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-C=O von V123	3.3 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-N–H von H125	3.1 Å
R178	Guanidiniumgruppe	Hydroxylgruppe von Y187	3.0 Å
	Guanidiniumgruppe	Guanidiniumgr. von R180	3.4 Å
N183	Amid-N–H	Amid-C=O von Q181	3.1 Å
Y185	Hydroxylgruppe	Amid-C=O von Q181	2.4 Å
Y187	Hydroxylgruppe	Amid-C=O von Q215	2.6 Å
E239	Carboxylgruppe	Guanidiniumgr. von R180	2 × 2.9 Å
Q277	Amid-C=O	Amin von K105	3.2 Å

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich die funktionellen Gruppen auf die Seitenketten.

Die Abstände der basischen Triade zu den *meta-O*-Atomen sind im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplex insgesamt etwas kürzer als im $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplex. Die Carbonylfunktion des K105-Rückgrats bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zu einer Amid-N–H-Funktion von Enterobactin aus. Die Seitenkette von Q181 dreht sich vom Ligand weg, was in einer im Vergleich zu $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ signifikant geschwächten Wasserstoffbrückenbindung resultiert. Des Weiteren verlieren N183 und Y185 ihre Wasserstoffbrückenbindungen mit der Q181-Seitenkette, welche teilweise durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung mit der Hauptketten-Carbonylfunktion von Q181 kompensiert wird. Q215 bildet mit seiner Hauptketten-N–H-Funktion eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu einer Carbonylfunktion des Liganden, während allerdings die Abstände zu den *ortho-O*-Atomen der DHB-Funktionen des Liganden deutlich größer sind. E239, der elektrostatische Gegenpart zu R180, zeigt geringfügig größere Abstände für seine zweizählige Interaktion mit R180, des Weiteren ist die Stabilisierung von K105 durch die

Wasserstoffbrückenbindung mit Q277 ebenfalls geringer als im FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Komplex. Die Reste T104, R178 und Y187 zeigen hingegen keine signifikanten Änderungen.

Tabelle 4-17: Interaktionen der in die [Fe^{III}(Ent)]³⁻-Bindung involvierten FeuA-Reste.

AS-Rest	interagierende Gruppe	Interaktionspartner	Entfernung
K84	Amin	<i>meta-O</i> von DHB1	2.9 Å
	Amin	<i>meta-O</i> von DHB3	2.5 Å
K105	Amin	<i>meta-O</i> von DHB1	2.9 Å
	Amin	<i>meta-O</i> von DHB2	3.3 Å
	Hauptketten-C=O	Amid-N-H von DHB2	3.4 Å
R180	Guanidiniumgruppe	<i>meta-O</i> von DHB2	2.8 Å
	Guanidiniumgruppe	<i>meta-O</i> von DHB3	2.9 Å
Q181	Amid-N-H	C=O von DHB3	3.6 Å
Q215	Amid-N-H	Amid-N-H von Ser3	3.2 Å
	Amid-N-H	<i>ortho-O</i> von DHB2	3.6 Å
	Amid-N-H	<i>ortho-O</i> von DHB3	3.2 Å
	Amid-C=O	Guanidiniumgr. von R180	2.8 Å
	Hauptketten-N-H	C=O von DHB2	3.0 Å
T104	Hydroxylgruppe	Imidazolring von H125	2.8 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-C=O von V123	3.4 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-N-H von H125	3.2 Å
R178	Guanidiniumgruppe	Hydroxylgruppe von Y187	2.8 Å
	Guanidiniumgruppe	Guanidiniumgr. von R180	3.3 Å
	Guanidiniumgruppe	Hydroxylgruppe von Y192	3.6 Å
N183	Amid-N-H	Amid-C=O von Q181	3.5 Å
Y185	–	–	–
Y187	Hydroxylgruppe	Amid-C=O von Q215	2.5 Å
	Hydroxylgruppe	Guanidiniumgr. von R180	3.6 Å
E239	Carboxylgruppe	Guanidiniumgr. von R180	2.9, 3.1 Å
Q277	Amid-C=O	Amin von K105	3.5 Å

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich die funktionellen Gruppen auf die Seitenketten.

Auch im FeuA·[Fe^{III}(mecam)]³⁻-Komplex sind die Abstände von K105 und R180 zu den *meta-O*-Atomen der Catecholatgruppen des Liganden etwas geringer als im FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻-Komplex. R180 wird durch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung mit Y187 zusätzlich stabilisiert, K105 hingegen verliert seine Stabilisierung durch die Wasserstoffbrückenbindung mit Q277. Der Seitenkette von Q181 konnte keine definierte Elektronendichte zugewiesen werden, daher stellen sich weder die in den anderen beiden

Komplexen beobachteten Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Liganden noch mit N183 und Y185 ein. Q215 bildet wie im FeuA·[Fe^{III}(Ent)]³⁻-Komplex auch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen seiner Rückgrat-N-H-Funktion und einer Carbonylfunktion des Liganden. Die Reste T104, R178 und Y187 zeigen wiederum keine signifikanten Änderungen.

Tabelle 4-18: Interaktionen der in die [Fe^{III}(mecam)]³⁻-Bindung involvierten FeuA-Reste.

AS-Rest	interagierende Gruppe	Interaktionspartner	Entfernung
K84	Amin	<i>meta</i> -O von DHB1	3.1 Å
	Amin	<i>meta</i> -O von DHB3	2.5 Å
K105	Amin	<i>meta</i> -O von DHB1	2.7 Å
	Amin	<i>meta</i> -O von DHB2	3.4 Å
R180	Guanidiniumgruppe	<i>meta</i> -O von DHB2	2.9 Å
	Guanidiniumgruppe	<i>meta</i> -O von DHB3	3.0 Å
Q181	–	–	–
Q215	Amid-N–H	Amid-N–H an DHB3	3.4 Å
	Amid-N–H	<i>ortho</i> -O von DHB2	3.3 Å
	Amid-N–H	<i>ortho</i> -O von DHB3	3.0 Å
	Amid-C=O	Guanidiniumgr. von R180	2.8 Å
	Hauptketten-N–H	C=O von DHB2	3.0 Å
T104	Hydroxylgruppe	Imidazolring von H125	2.7 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-C=O von V123	3.2 Å
	Hydroxylgruppe	Rückgrat-N–H von H125	3.0 Å
R178	Guanidiniumgruppe	Hydroxylgruppe von Y187	2.8 Å
	Guanidiniumgruppe	Guanidiniumgr. von R180	3.5 Å
	Guanidiniumgruppe	Hydroxylgruppe von Y192	3.6 Å
N183	–	–	–
Y185	–	–	–
Y187	Hydroxylgruppe	Amid-C=O von Q215	2.5 Å
E239	Carboxylgruppe	Guanidiniumgr. von R180	2.9, 3.1 Å
Q277	–	–	–

Sofern nicht anders angegeben beziehen sich die funktionellen Gruppen auf die Seitenketten.

Die einzige direkte Interaktion zwischen Resten der *N*- und der *C*-terminalen Domäne in allen drei Cokristallstrukturen ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen K105 und Q277, während alle anderen Interaktionen direkt oder indirekt auf die Präsenz des Liganden angewiesen sind.

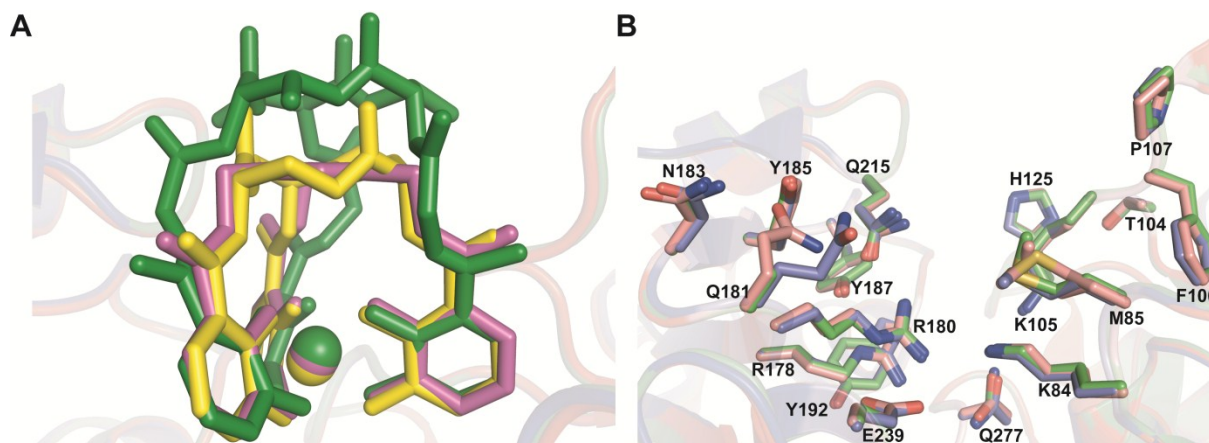


Abbildung 4-26: Überlagerung der Liganden und der Bindungstasche.

A) Überlagerung der Liganden in der Bindungstasche. $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ ist in grün, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ in gelb und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ in violett dargestellt. B) Überlagerung der die Bindungstasche ausbildenden Reste.

Betrachtet man die Positionen der Liganden in der Bindungstasche, so sind diese fast identisch. Dies drückt sich auch in den Positionen der an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligten Reste aus (Abb. 4-26), die jeweils sehr ähnliche Positionen einnehmen und damit eine in der Gesamtheit ähnliche Form und Oberfläche der Bindungstasche erzeugen. Indess muss berücksichtigt werden, dass sich die hier gezeigten Beobachtungen auf die Proteinkomplexe im kristallinen Zustand beziehen, welcher nur eine „Momentaufnahme“ darstellen kann und etwaige Dynamiken nur in sehr begrenztem Rahmen vermuten lässt.

Die elektrostatische Oberfläche der Bindungstasche ist basisch um die negativ geladenen Substrate aufnehmen zu können (Abb. 4-27). Neben der Domänenbewegung zeigt auch die Bindungstasche Veränderungen bei Substratbindung: Negativ geladene Reste werden stärker im Inneren des Proteins verdeckt. Die restliche Proteinoberfläche ändert sich indess nicht signifikant.

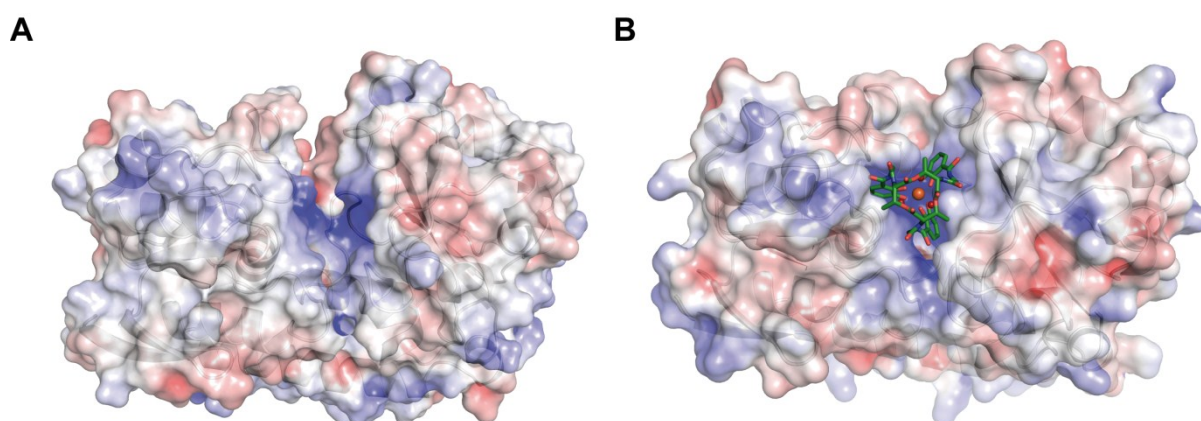


Abbildung 4-27: Elektrostatische Oberfläche von apo- und holo-FeuA.

A) apo-FeuA. B) FeuA- $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. Gezeigt ist die elektrostatische Oberfläche von -5 (rot) bis $+5$ (blau) $k_{\text{B}}T/e_c$.

4.2.6 Bindungsaffinitäten

Die Bindungsaffinität von FeuA gegenüber $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ wurde bereits im Jahr 2006 mit $57 \pm 1 \text{ nmol L}^{-1}$ bestimmt.^[191] Neuere Untersuchungen zeigten Ergebnisse in derselben mittleren nanomolaren Größenordnung von $26.5 \pm 1.4 \text{ nmol L}^{-1}$ ^[272] bzw. $15 \pm 4 \text{ nmol L}^{-1}$.^[273] Für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ wurde bereits eine Dissoziationskonstante von $19 \pm 5 \text{ nmol L}^{-1}$ ermittelt.^[273]

In eigenen Fluoreszenzuntersuchungen (Abb. 4-28) wurden die in Tab. 4-19 angegebenen Dissoziationskonstanten erhalten. Die Affinität für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ wurde mit 40 nmol L^{-1} bestimmt und lag damit in der Größenordnung des endogenen Siderophors BB. Für das synthetische Komplexanion $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ wurde eine deutlich geringere Affinität im unteren mikromolaren Bereich beobachtet. Diese Untersuchungen wurden von Dr. Marcus Miethke durchgeführt.

Tabelle 4-19: Affinitäten von FeuA gegenüber verschiedenen Liganden.

Ligand	K_D	K_D (Literatur)
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	–	$57 \pm 1 \text{ nmol L}^{-1}$ ([191]) $26.5 \pm 1.4 \text{ nmol L}^{-1}$ ([272]) $15 \pm 4 \text{ nmol L}^{-1}$ ([273])
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$	$40 \pm 10 \text{ nmol L}^{-1}$	$19 \pm 5 \text{ nmol L}^{-1}$ ([273])
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$	$1.03 \pm 0.03 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	–
$[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$	$8.38 \pm 0.26 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	–
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$	$> 10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$	–

K_D : Dissoziationskonstante.

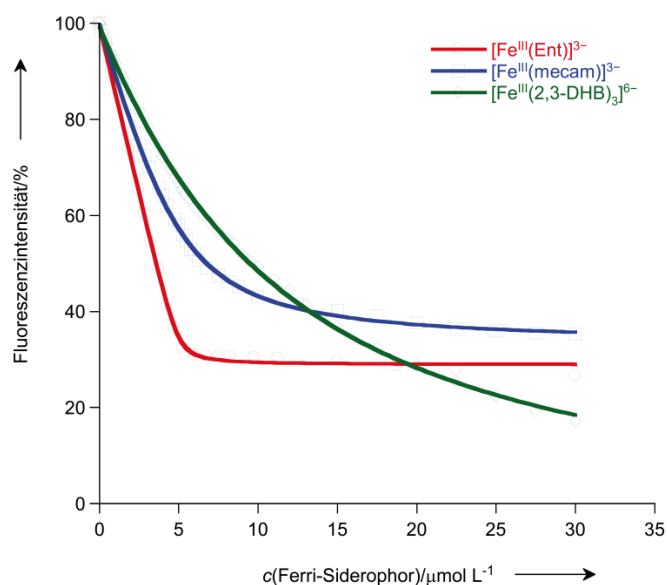


Abbildung 4-28: Analyse der Fluoreszenzlöschung von FeuA durch verschiedene Liganden.

Die gezeigten Daten wurden von Dr. Marcus Miethke aufgenommen. c: Konzentration.

Die FeuA-Varianten K84A, K105A, R180A sowie R178A und K213A wurden mittels Fluoreszenzspektroskopie qualitativ auf ihre Fähigkeit untersucht, das endogene Substrat $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ zu binden.

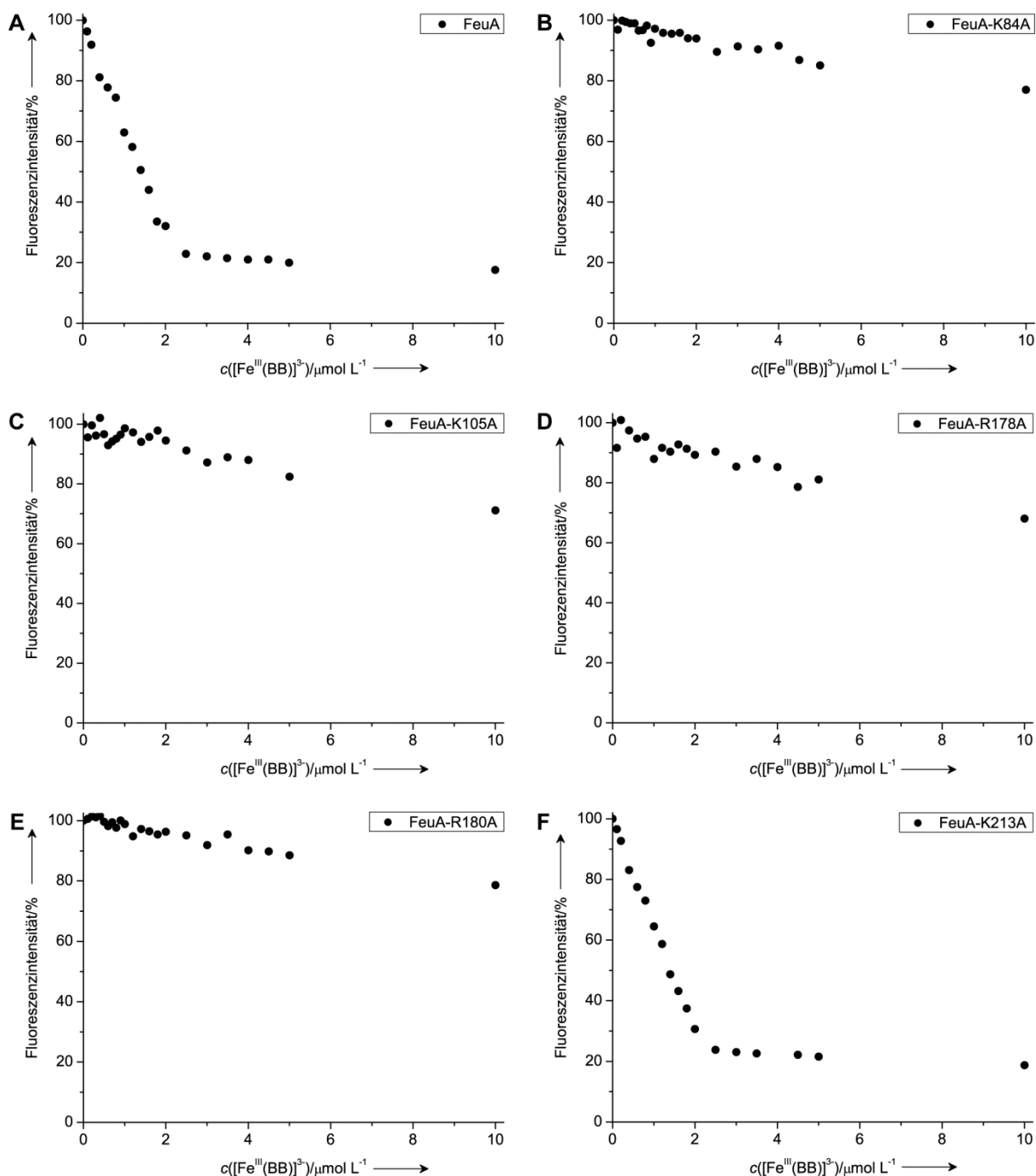


Abbildung 4-29: Analyse der Fluoreszenzlöschung von nativem FeuA und seinen Varianten durch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$.

A) Natives FeuA. B) FeuA-K84A. C) FeuA-K105A. D) FeuA-R178A. E) FeuA-R180A. F) FeuA-K213A. c: Konzentration.

Während natives FeuA sowie die Variante K213A die erwarteten Affinitäten im nanomolaren Bereich aufwiesen, zeigten die Alaninvarianten der basischen Triade sowie die Variante R178A deutlich verminderte Affinitäten, die geschätzt um etwa drei Größenordnungen geringer waren (Abb. 4-29).

4.2.7 Proteinstabilisierung und thermische Stabilität

Viele Proteine zeigen bei Bindung ihres Substrats erhöhte Schmelztemperaturen, die durch verstärkte Interaktionen innerhalb des Proteins und die Wechselwirkungen mit dem Liganden verursacht werden. Die

Ligandenabhängigkeit sollte hier in jedem Fall bestehen, da die Kristallstrukturen nur eine einzige direkte Interaktion zwischen *N*- und *C*-terminaler Domäne innerhalb der Bindungstasche aufwiesen. Die Bedeutung der basischen Triade für die Ligandenbindung und die Strukturstabilisierung wurde mit ligandenabhängiger Schmelzpunktanalyse der FeuA-Varianten weiter untersucht. Dabei wurde das CD-Signal bei 222 nm über einen Temperaturbereich von 5-95 °C beobachtet (Abb. 4-30).

Das native Protein und die Variante K213A zeigten bei äquimolarer Zugabe von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ eine Erhöhung ihres Schmelzpunktes um etwa 8 °C. Die Stabilität der drei Einzelsubstitutionen der basischen Triade sowie der Variante R178A wurde hingegen in Gegenwart des Siderophors nicht beeinflusst. Die Variante R180A bildete weiterhin im Gegensatz zum nativen Protein und zu allen anderen Varianten bei erhöhter Temperatur ein Präzipitat. Die genauen Schmelzpunkte sind in Tab. 4-20 angegeben.

Weiterhin wurde die Fähigkeit exogener Siderophore untersucht, das native Protein zu stabilisieren (Abb. 4-31). Dabei zeigte sich, dass durch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ eine vergleichbare Stabilisierung wie durch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ auftritt. Hingegen konnte durch die Eisenkomplexanionen des entfernt verwandten Triscatecholatsiderophors Vibriobactin und des Siderophorvorläufers 2,3-DHB, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$, keine Stabilisierung der Proteinfaltung erreicht werden (Tab. 4-21).

Tabelle 4-20: Schmelzpunkte der FeuA-Varianten in An- und Abwesenheit von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$.

FeuA-Variante	$T_M/^\circ\text{C}$	
	$- [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	$+ [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$
nativ	58.15 ± 0.02	65.99 ± 0.04
K84A	63.12 ± 0.03	62.93 ± 0.06
K105A	59.64 ± 0.03	59.44 ± 0.05
R178A	56.96 ± 0.04	57.33 ± 0.06
R180A	58.82 ± 0.98	58.78 ± 1.04
K213A	50.84 ± 0.05	58.74 ± 0.07

T_M : Schmelztemperatur, berechnet mit Spectra Analysis Software, Jasco Corporation.

Tabelle 4-21: Schmelzpunkte von FeuA in Anwesenheit verschiedener Liganden.

Ligand	$T_M/^\circ\text{C}$
–	59.42 ± 0.03
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	65.06 ± 0.04
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$	68.82 ± 0.22
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$	70.79 ± 0.19
$[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$	59.52 ± 0.04
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$	57.25 ± 0.14

T_M : Schmelztemperatur, berechnet mit Spectra Analysis Software, Jasco Corporation.

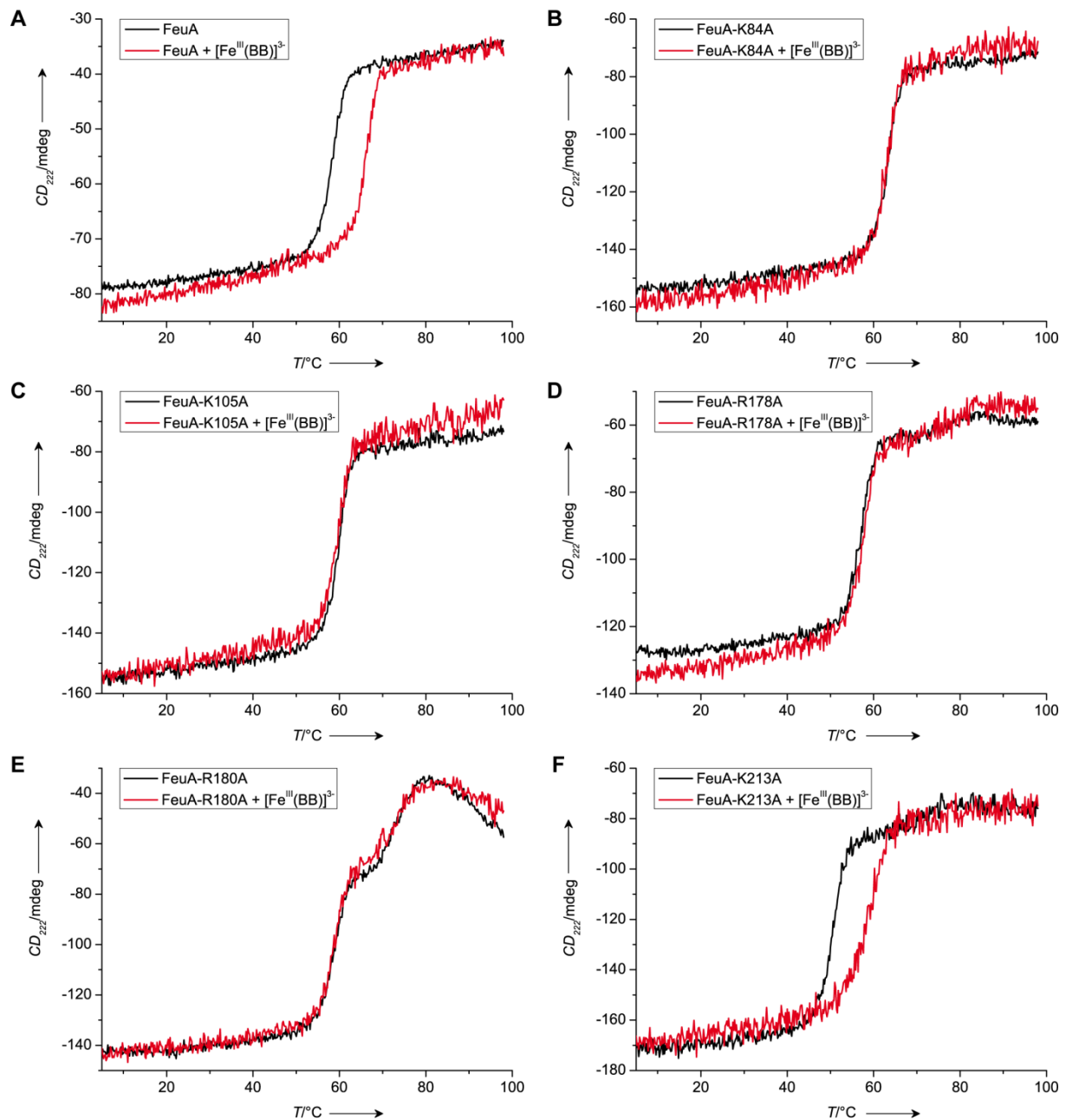


Abbildung 4-30: Schmelzkurven von nativem FeuA und seinen Varianten in An- und Abwesenheit von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$.

CD_{222} : CD-Signal bei 222 nm, T : Temperatur.

Bei gleichmäßiger Abkühlung (Renaturierung) des Proteins zeigte sich, dass FeuA mit einem Anteil von etwa 80% rückgefaltet werden konnte. Dies war unabhängig davon, ob eine vorherige Stabilisierung mit einem der Liganden erfolgt war (Abb. 4-31).

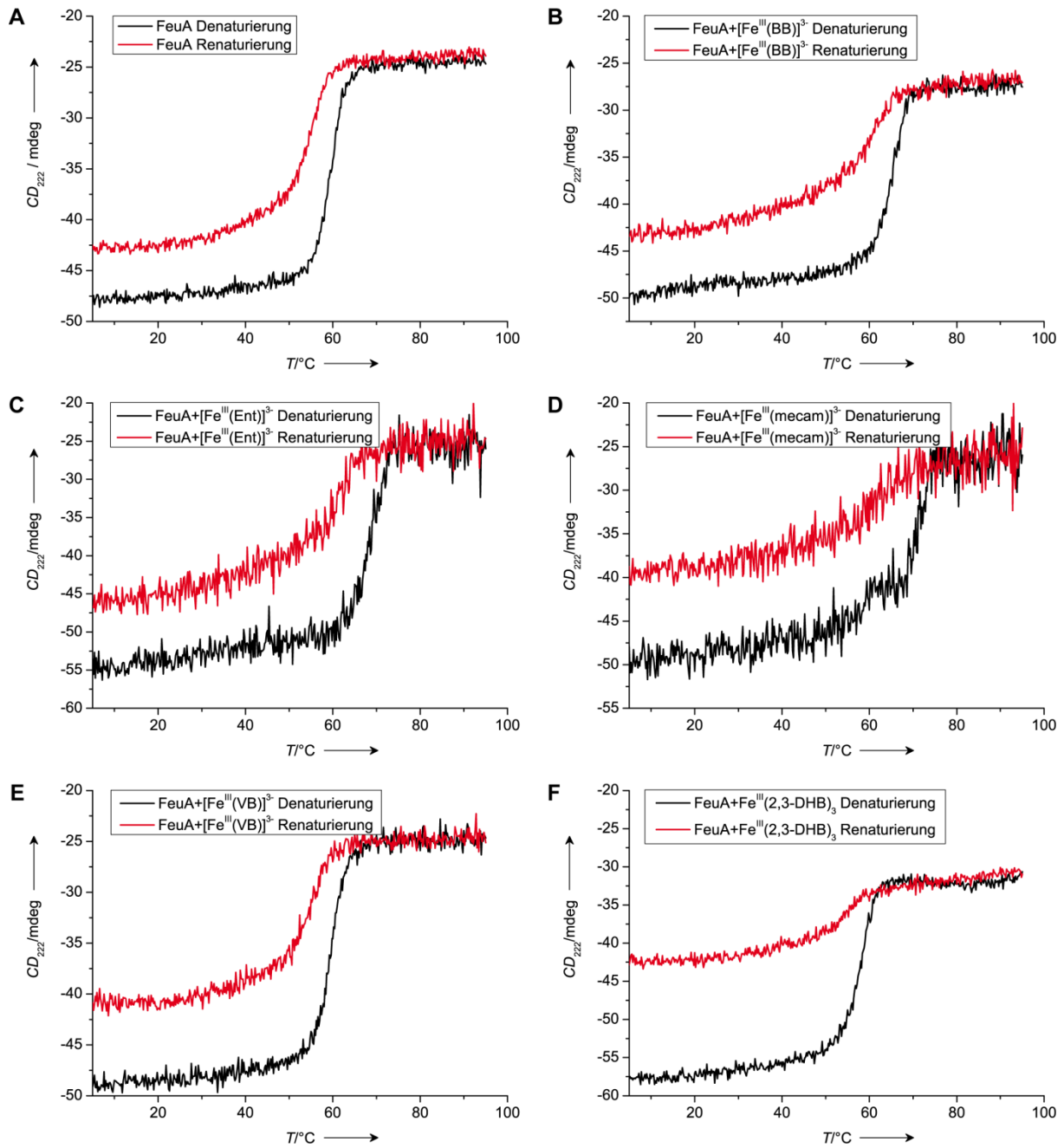


Abbildung 4-31: De- und Renaturierungskurven von FeuA in Anwesenheit verschiedener Liganden.

CD_{222} : CD-Signal bei 222 nm, T : Temperatur.

4.2.8 Charakterisierung der Liganden

4.2.8.1 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$

Die strukturellen Charakteristika des durch FeuA gebundenen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplexanions entsprechen etwa denen des $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{Ent})]^{2-}$ -Komplexanions. Die Kleinmolekülkristallstruktur dieses Komplexanions wurde im Jahr 1992 gelöst^[274-275] und wird hier als Basis zur Beschreibung verwendet. Der Gesamtkomplex besitzt annähernd C_3 -Punktsymmetrie. Die C_3 -Achse wurde für die folgenden Berechnungen wie folgt definiert: Die drei *ortho*- und die drei *meta*-O-Atome der Catecholateinheiten formen jeweils eine Ebene. Die Senkrechte zum Mittel dieser Ebenen wurde dann als C_3 -Achse definiert. Da im Folgenden insbesondere die Catecholateinheiten betrachtet wurden, wurde von einer Definition durch den Trilactonring abgesehen, da dieser am weitesten vom Triscatechol-Metall-Zentrum entfernt ist und der Bezug zu dessen Symmetrie aufgrund konformationeller Flexibilität nicht mehr zwangsläufig gegeben war. Die Definition der C_3 -Achse ist in Abb. 4-32 graphisch dargestellt.

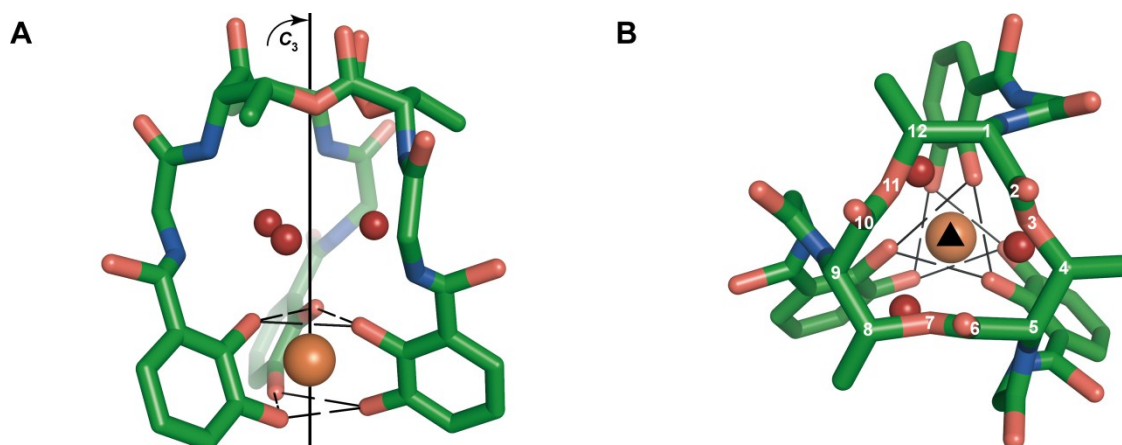


Abbildung 4-32: Definition der C_3 -Achse in $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$.

A) Seitlicher Blick auf die Achse. Die die Achse definierenden Ebenen sind jeweils durch schwarze Linien dargestellt. B) Blick entlang der Achse. Weiterhin ist der zwöfgliedrige Ring verdeutlicht.

Ein stabiler, zwöfgliedriger Ring wird durch die drei Threonin-Einheiten gebildet, die das Trilacton aufbauen (Abb. 4-32B). Die Stereokonfiguration der Threoninreste kann dabei eindeutig als *2S,3R* bestimmt werden (L-Threonin), eine *2S,3S*-Konfiguration wie sie in *allo*-L-Threonin vorkommt, kann ausgeschlossen werden (Abb. 4-33A). Die Carbonylgruppen des Rings zeigen vom Metallzentrum weg, wie dies auch im $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{Ent})]^{2-}$ -Komplexanion beobachtet wurde. Diese Konformation wird energetisch durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Drei Wassermoleküle interkalieren zwischen den Trilactonring und das Triscatechol-Metall-Zentrum. Die Abstände zwischen den drei Wassermolekülen liegen dabei im Bereich von 3.1 Å bis 3.5 Å. Neben der Wechselwirkung mit den anderen Wassermolekülen formt ein einziges Wassermolekül weitere Interaktionen mit vier N-H-Gruppen der Amidbindungen des Liganden, einem verbrückenden O-Atom des Trilactonrings sowie zwei *ortho*-O-Atomen der Catecholateinheiten (Abb. 4-33B). Die drei Wassermoleküle fungieren daher als Schnittstelle für ein Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk innerhalb des Liganden.

Die Catecholamidarme weisen annähernd Planarität auf, daher sollten die Wasserstoffatome der Amidbindung zwischen 2,3-DHB- und Gly-Einheiten (N–H) eine inseitige Orientierung aufweisen und mit Teilen der Catecholat-Einheit einen sechsgliedrigen Ring formen. Dadurch werden die *ortho*-O-Atome der Catecholate durch Wasserstoffbrückenbindungen weiter stabilisiert.

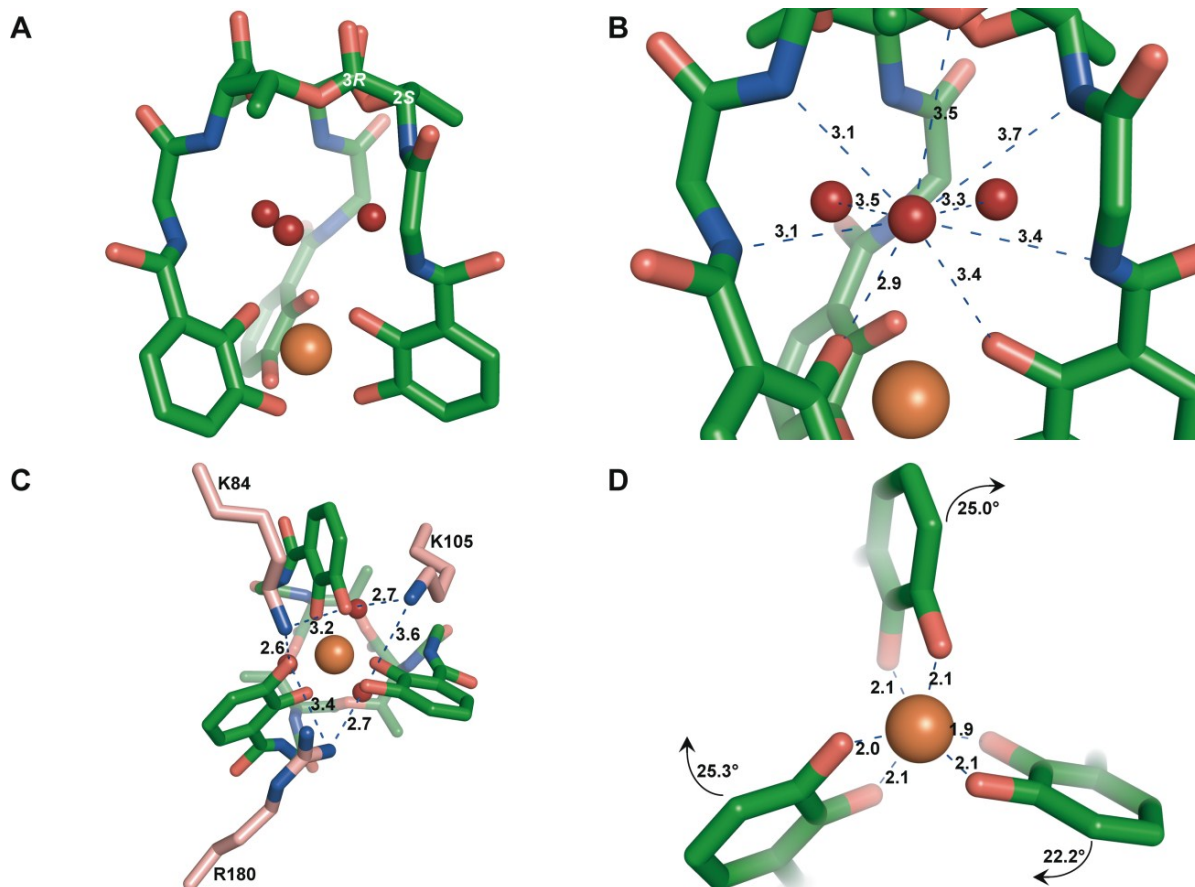


Abbildung 4-33: Strukturelle Charakteristika von FeuA-gebundenem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$.

A) Gesamtansicht des Komplexanions. B) Abstände zwischen einem Wassermolekül und seinen Interaktionspartnern in Å. C) Abstände zwischen der basischen Triade und den *meta*-O-Atomen in Å. D) Kippungsbewegung der Catecholateinheiten (Position entspricht (C)). Die Bindungslängen zwischen den O-Atomen und Fe^{III} sind in Å angegeben.

Ein Rest der basischen Triade interkaliert stets zwischen zwei Catecholateinheiten, dabei ist der Abstand zu deren *meta*-O-Atomen jedoch nicht gleich (Abb. 4-33C). Die längeren Abstände betragen 3.2 Å, 3.6 Å sowie 3.4 Å und die kürzeren Abstände 2.6 Å, 2.7 Å und 2.7 Å (jeweils für K84, K105 und R180). Die Winkel der Kippbewegung der drei Catecholateinheiten relativ zur (näherungsweisen) C_3 -Achse betragen 25.0°, 22.2° und 25.3° und bilden damit eine leicht verzerrte oktaedrische Koordinationssphäre des Eisen(III)-Zentrums. Die *ortho*- und *meta*-O-Atome bilden dabei Abstände zum Eisen(III)-Ion von jeweils 2.1 Å und 2.1 Å, 1.9 Å und 2.1 Å sowie 2.1 Å und 2.0 Å aus (Abb. 4-33D).

Da der Trilactonring aus drei L-Threonineinheiten aufgebaut ist, resultiert aus der Chiralität am Metallzentrum (Δ oder Λ) ein diastereomeres Komplexanion. Das Metallzentrum des an FeuA gebundenen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ weist eine Λ -Konfiguration auf, was ebenfalls CD-spektroskopisch bestätigt wurde (Abb. 4-34).

Die Λ -Konfiguration, welche von anderen Gruppen auch für das Komplexanion in freier Lösung beobachtet wurde,^[276-277] konnte in den eigenen Untersuchungen nicht festgestellt werden.

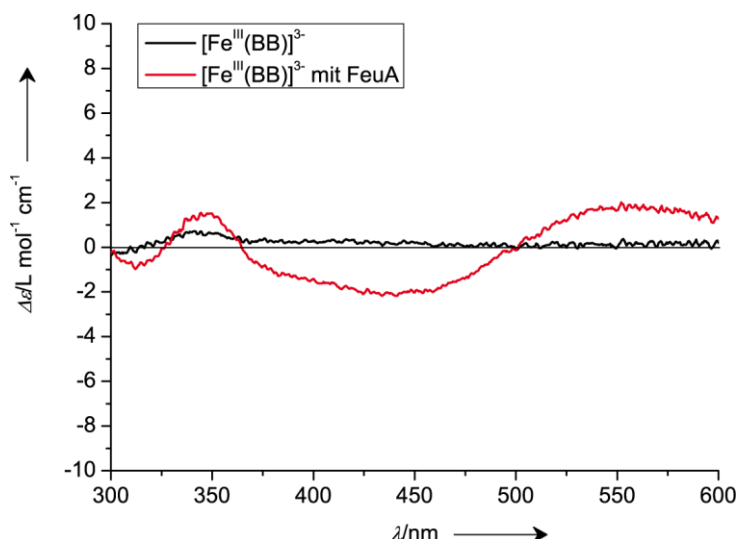


Abbildung 4-34: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ in An- und Abwesenheit von FeuA.

$\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

4.2.8.2 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$

Die beobachtete Konfiguration des an FeuA gebundenen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanions unterscheidet sich teils deutlich von der Konfiguration des $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{Ent})]^{2-}$ -Komplexanions. Der Trilactonring weist eine lokal gebrochene Symmetrie auf, da eine der drei Carbonylgruppen seitlich von der Ringebene wegzeigt (Abb. 4-35A und B). Betrachtet man die Catecholateinheiten gesondert vom Trilactonrückgrat, so weist der Komplex wiederum näherungsweise C_3 -Punktsymmetrie auf. Die Planarität der Catecholamidarme und die daraus resultierenden Sechsringe sollten wiederum zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Amidprotonen zu den *ortho*-O-Atomen der Catecholat-Einheiten führen.

Die kürzeren Abstände der basischen Triade zu den *meta*-O-Atomen betragen dabei 2.9 Å, 3.3 Å und 2.9 Å und die kürzeren Abstände 2.5 Å, 2.9 Å und 2.8 Å (jeweils für K84, K105 und R180) (Abb. 4-35C). Die Winkel der Kippbewegung der drei Catecholate relativ zur (näherungsweisen) C_3 -Achse betragen 11.8°, 7.6° und 10.8°. Die *ortho*- und *meta*-O-Atome bilden Abstände zum Eisen(III)-Ion von jeweils 2.1 Å und 2.1 Å, 2.0 Å und 2.1 Å sowie 2.1 Å und 2.1 Å aus (Abb. 4-35D).

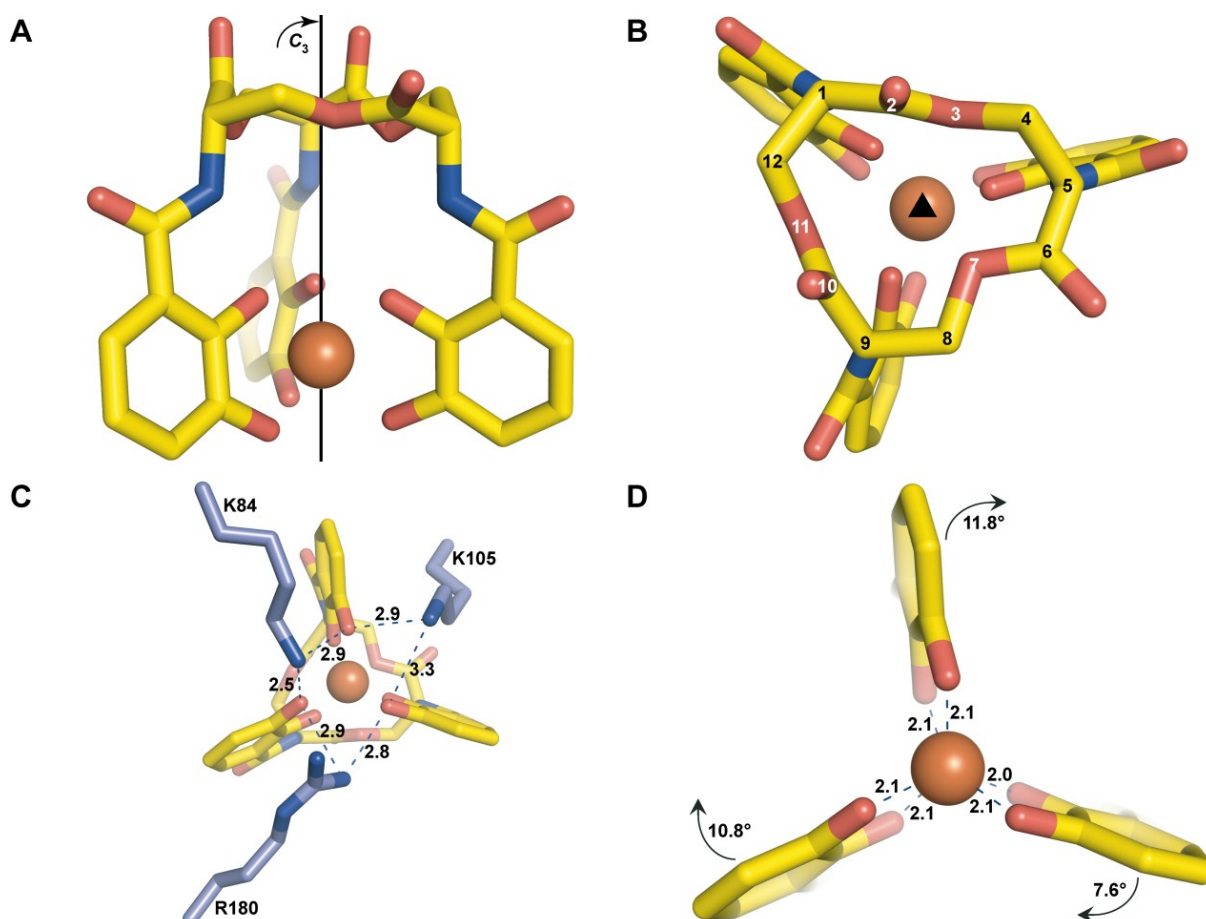


Abbildung 4-35: Strukturelle Charakteristika von FeuA-gebundenem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$.

A) Gesamtansicht des Komplexanions. Die (näherungsweise) C_3 -Achse ist dargestellt. B) Blick entlang der (näherungsweise) C_3 -Achse des Komplexanions. Weiterhin ist der zwölfgliedrige Ring verdeutlicht. C) Abstände zwischen der basischen Triade und den *meta*-O-Atomen in Å. D) Kippbewegung der Catecholateneinheiten (Position entspricht C)). Die Bindungslängen zwischen den O-Atomen und Fe^{III} sind in Å angegeben.

Das Metallzentrum des an FeuA gebundenen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanions weist ebenso wie $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ Λ -Symmetrie auf. In freier Lösung zeigt das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanion hingegen Δ -Symmetrie, was sich CD-spektroskopisch bestätigen ließ (Abb. 4-36).

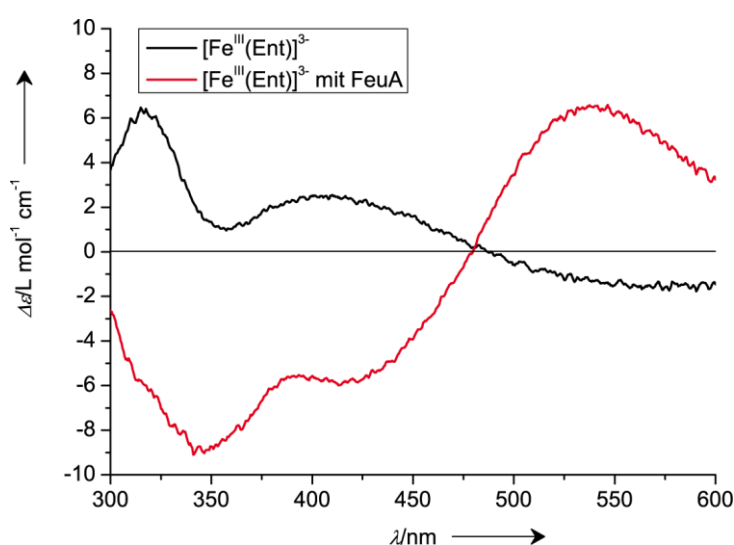


Abbildung 4-36: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ in An- und Abwesenheit von FeuA.

$\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

4.2.8.3 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$

Das an FeuA gebundene $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexanion weist ebenfalls eine näherungsweise C_3 -Punktsymmetrie auf, die aufgrund seines sechsgliedrigen Arylrings, der das konformationell wesentlich flexiblere Trilactonrückgrat von BB und Ent ersetzt, deutlich zu erkennen ist (Abb. 4-37A und B).

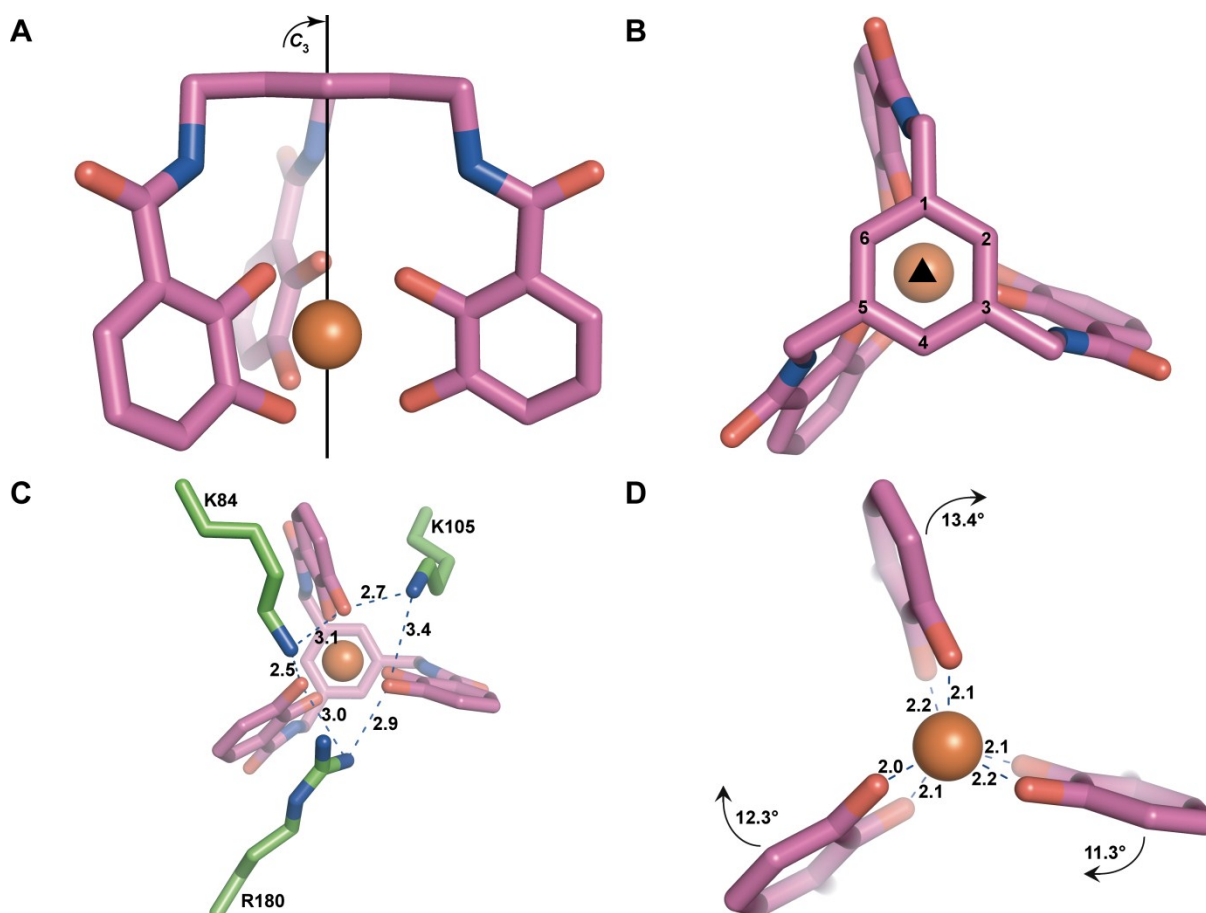


Abbildung 4-37: Strukturelle Charakteristika von FeuA-gebundenem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$.

A) Gesamtansicht des Komplexanions. B) Blick entlang der (näherungsweisen) C_3 -Achse des Komplexanions. C) Abstände zwischen der basischen Triade und den *meta-O*-Atomen in Å. D) Kippbewegung der Catecholateinheiten (Position entspricht (C)). Die Bindungslängen zwischen den O-Atomen und Fe^{III} sind in Å angegeben.

Die basische Triade weist Abstände zu den *meta-O*-Atomen der Catecholateinheiten von 3.1 Å, 3.4 Å und 3.0 Å sowie 2.5 Å, 2.7 Å und 2.9 Å auf (jeweils für K84, K105 und R180) (Abb. 4-37C).

Relativ zur (näherungsweisen) C_3 -Achse wurden Winkel der Kippbewegung der Catecholateinheiten von 13.4°, 11.3° und 12.3° beobachtet. Die Abstände der *ortho*- und *meta-O*-Atome zum Eisen(III)-Ion betragen 2.2 Å und 2.1 Å, 2.1 Å und 2.2 Å sowie 2.1 Å und 2.0 Å (Abb. 4-37D). In freier Lösung weist das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexanion keine bevorzugte Stereokonfiguration am Metallzentrum auf und liegt als Racemat vor. Gebunden an FeuA weist $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ wie auch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ Λ -Konfiguration auf (Abb. 4-38).

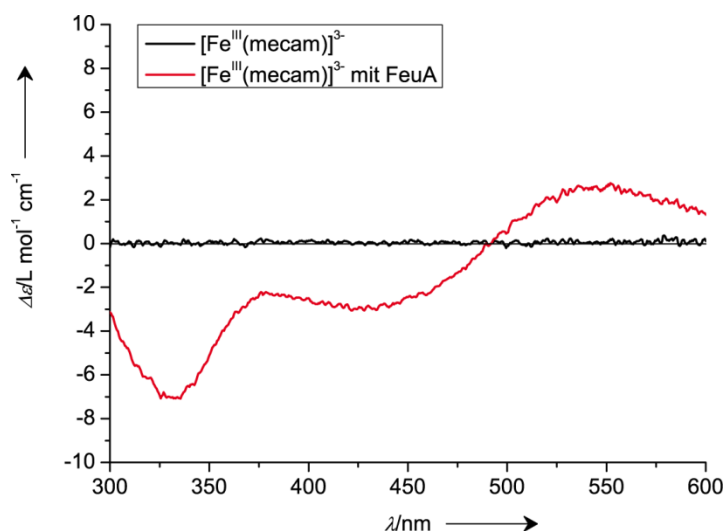


Abbildung 4-38: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ in An- und Abwesenheit von FeuA.

$\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

4.2.8.4 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$

Die Fluoreszenzuntersuchungen zeigten, dass FeuA nicht fähig ist das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ -Komplexanion zu binden (Kapitel 4.2.6) und auch keine ligandenabhängige Schmelzpunktstabilisierung des Proteins auftritt (Kapitel 4.2.7). Dementsprechend sollten auch keine Veränderungen der Stereokonfiguration von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ bei Zugabe von FeuA auftreten, was durch CD-spektroskopische Untersuchungen bestätigt wurde (Abb. 4-39A).

$[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ wurde hingegen durch FeuA mit niedriger Affinität gebunden (Kapitel 4.2.6), allerdings konnte keine ligandenabhängige Schmelzpunktstabilisierung des Proteins erreicht werden (Kapitel 4.2.7). CD-spektroskopische Untersuchungen zeigte geringe, aber dennoch signifikante Anzeichen für eine Λ -artige Konfiguration am Metallzentrum des $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ -Komplexanions (Abb. 4-39B).

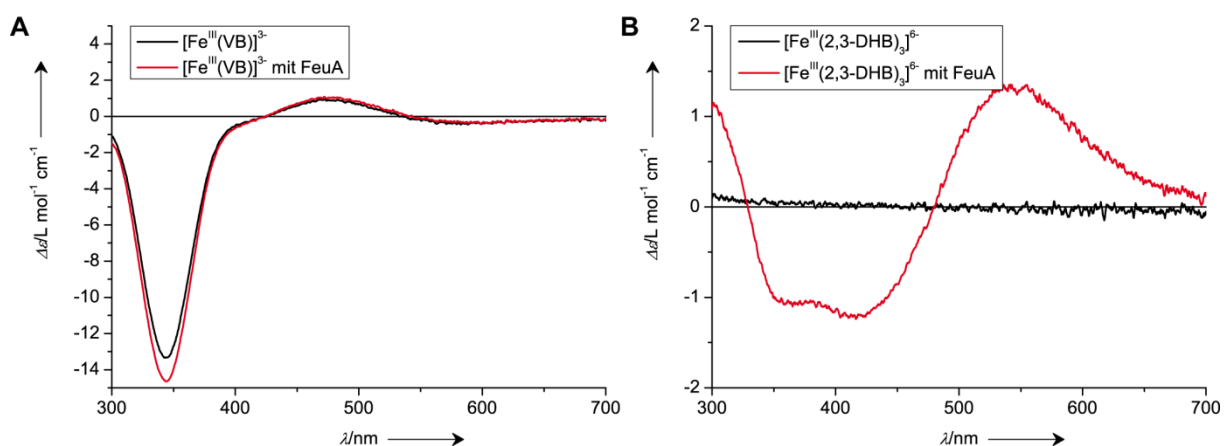


Abbildung 4-39: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ in An- und Abwesenheit von FeuA.

A) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$. $\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

4.2.8.5 Vergleich der Ligandkomplexanionen

Die drei mit hoher bis mittlerer Affinität von FeuA gebundenen Eisen(III)–Siderophor-Komplexanionen zeigen insgesamt sehr ähnliche Eigenschaften, sowohl was ihren Bindungsmodus als auch was ihre geometrischen und stereochemischen Charakteristika angeht (Tab. 4-22).

Tabelle 4-22: Vergleich der Siderophorkomplexe.

Komplexanion	Abstand <i>meta</i> -O–	Abstand	Abstand	Winkel der Kippbewegung
	K84	<i>meta</i> -O–K105	<i>meta</i> -O–R180	
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$	2.6 Å, 3.2 Å	2.7 Å, 3.6 Å	2.7 Å, 3.4 Å	25.0°, 22.2°, 25.3°
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$	2.5 Å, 2.9 Å	2.9 Å, 3.3 Å	2.8 Å, 2.9 Å	11.8°, 7.6°, 10.8°
$[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$	2.5 Å, 3.1 Å	2.7 Å, 3.4 Å	2.9 Å, 3.0 Å	13.4°, 11.3°, 12.3°

Dabei sind besonders die insgesamt deutlich größeren Winkel der Kippbewegung der Catecholateinheiten im FeuA-gebundenen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ verglichen mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ zu beachten.

Weiterhin ermöglichen diese drei Eisen(III)–Siderophor-Komplexanionen Stabilisierungen des Proteins gegenüber Hitzedenaturierung in vergleichbarer Größenordnung (Kapitel 4.2.7) und zeigen allesamt Λ -Stereokonfiguration nach Bindung an FeuA (Abb. 4-40). Eine Λ -ähnliche Konfiguration kann anhand der CD-Spektren ebenfalls für $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ angenommen werden, nicht jedoch für das entfernt verwandte Triscatecholsiderophor $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$.

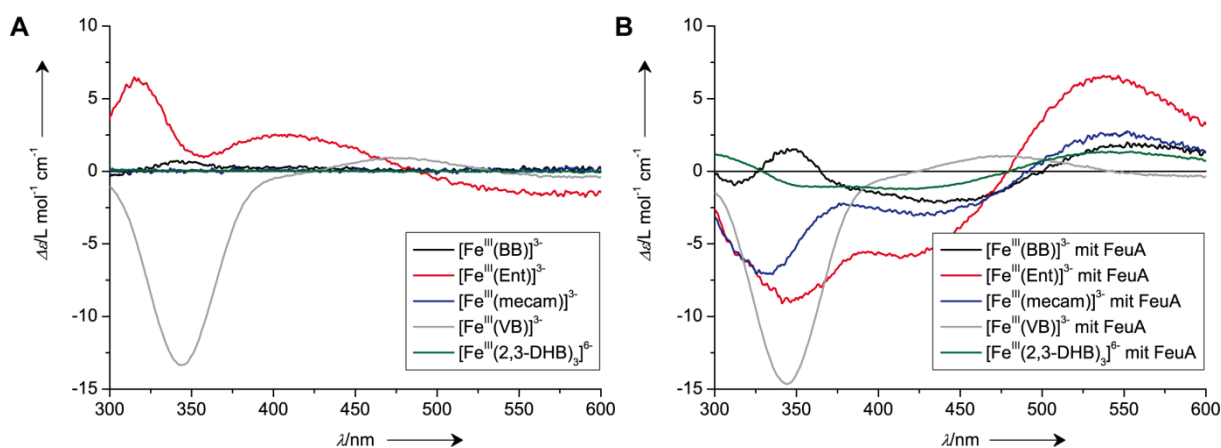


Abbildung 4-40: VIS-CD-Spektren aller untersuchten Ligandkomplexanionen in An- bzw. Abwesenheit von FeuA.

A) Spektren in freier Lösung. B) Spektren in Anwesenheit von FeuA. $\Delta\epsilon$: differentieller molarer CD-Extinktionskoeffizient, λ : Wellenlänge.

Abschließend wurde die Stereokonfiguration der Siderophore $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ in Gegenwart ihrer Esterase BesA bestimmt. Um durch die BesA-Hydrolyseaktivität bedingte Artefakte zu vermeiden wurde hierbei mit der katalytisch inaktiven Variante BesA-S188A gearbeitet, bei welcher das aktive Serin durch Alanin substituiert ist.

Es zeigte sich, dass $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ wie in freier Lösung eine Δ -Konfiguration einnimmt und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ eine schwach ausgeprägte Δ -Konfiguration (Abb. 4-41).

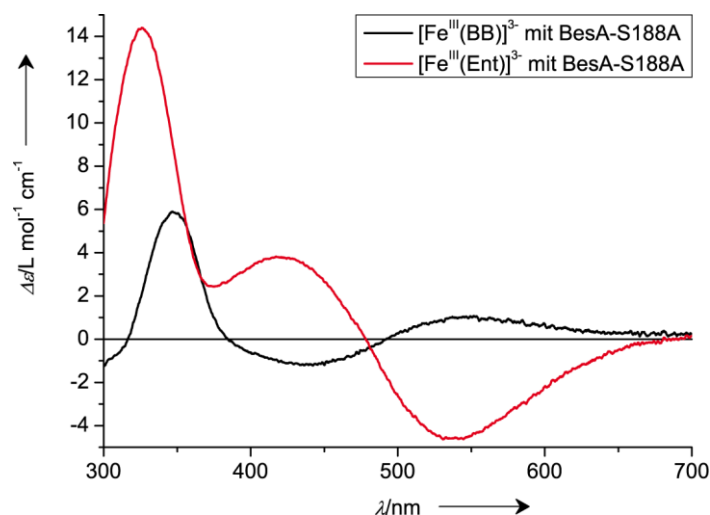


Abbildung 4-41: VIS-CD-Spektren von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ in Anwesenheit der katalytisch inaktiven Esterase BesA-S188A.

4.2.8.6 *in crystallo*-Absorptionsspektroskopie

Die Reaktion der gebundenen Substrate auf die hochenergetische Synchrotronröntgenstrahlung wurde mittels *online-in crystallo*-Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums untersucht.

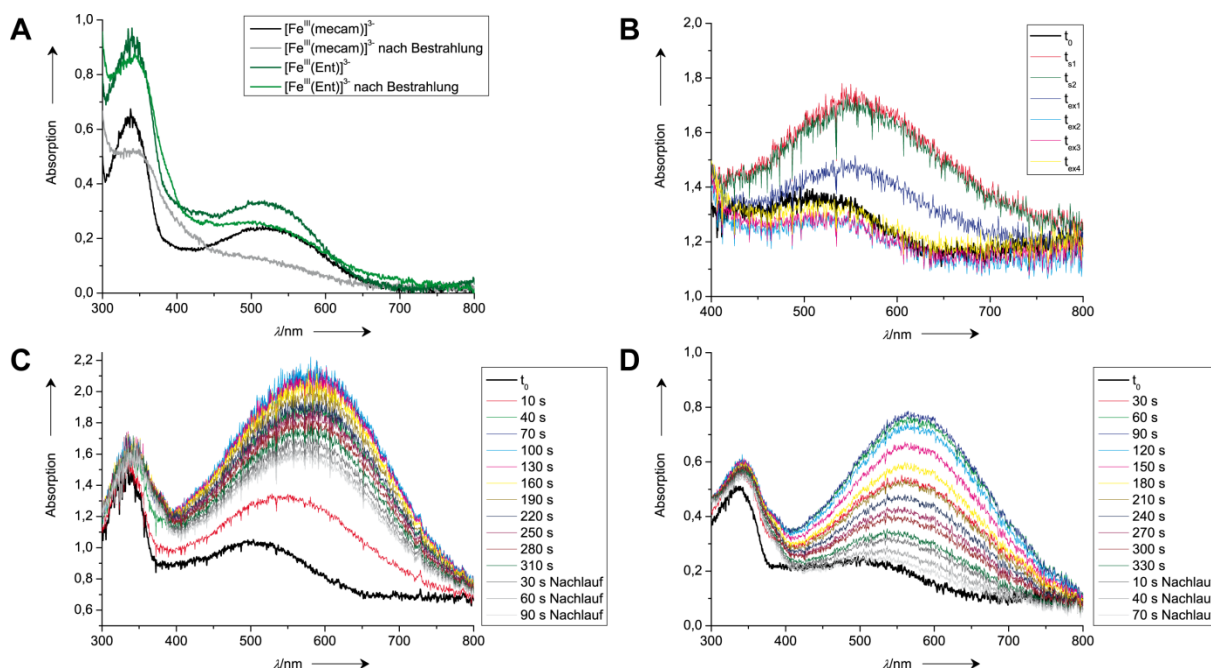


Abbildung 4-42: *in crystallo*-Absorptionsspektren von FeuA-Siderophor-Kristallen.

A) Erste Experimente mit FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ - und FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Kristallen. B) Spektren während der Datensammlung an einem FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Kristall, jeweils in der Ursprungsposition. t_0 : vor Bestrahlung. t_{s1} : 20 s. t_{s2} : 30 s. t_{ex1-4} : nach je 90° Datensammlung (6 s/°, Messintervall 1°). C) Absorption eines FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Kristalls während und nach der Bestrahlung. D) Absorption eines FeuA· $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Kristalls während und nach Bestrahlung.

Erste Messungen von Kristallen von denen Datensätze aufgenommen worden waren (Abb. 4-42A) legten eine strahlenbedingte Reduktion des Eisen(III)-Zentrums nahe, da die *charge transfer*-Bande des Komplexes bei etwa 520 nm abgenommen hatte. Diese Experimente wurden im ID29S-Cryobench-Labor der ESRF durchgeführt, allerdings lag zwischen Datensammlung und Messung im Labor ein Zeitraum von mehreren Wochen, so dass die Unterschiede in den Spektren auch dem allgemeinen Strahlenschaden des Kristalls geschuldet sein könnten.

Genauere Experimente die mit einem *online*-Microspectrophotometer durchgeführt wurden zeigten hingegen, dass die Absorption bereits nach kurzer Exposition des Kristalls mit Synchrotronröntgenstrahlung deutlich zunahm (bis zu einem Zeitwert von etwa 120 s) und zudem eine Rotverschiebung von bis zu 80 nm zeigte. Die Absorption näherte sich jedoch unabhängig davon ob der Kristall weiter bestrahlt wurde oder nicht wieder dem Ursprungswert an, auch wenn eine geringe Rotverschiebung blieb (Abb. 4-42C und D). Allerdings zeigten beiden Kristalle eine nach wie vor erhöhte Absorption bei ca. 340 nm. Die Position der Kristalle in diesen Experimenten war bei allen gemessenen Spektren identisch. Bei Messung eines Röntgenbeugungsdatensatzes von $4 \times 90^\circ$ und jeweiliger Messung eines Spektrums in der Ursprungsposition des $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Kristalls zeigte sich, dass der Kristall nach längerer Bestrahlung geringere Absorptionen als vor der Röntgenexposition aufwies (Abb. 4-42B). Dies bestätigte die ersten Experimente, bei denen diese Abnahme ebenfalls beobachtet worden war.

5 Diskussion

5.1 *Petrobactin und sein Bindungsprotein FpiA*

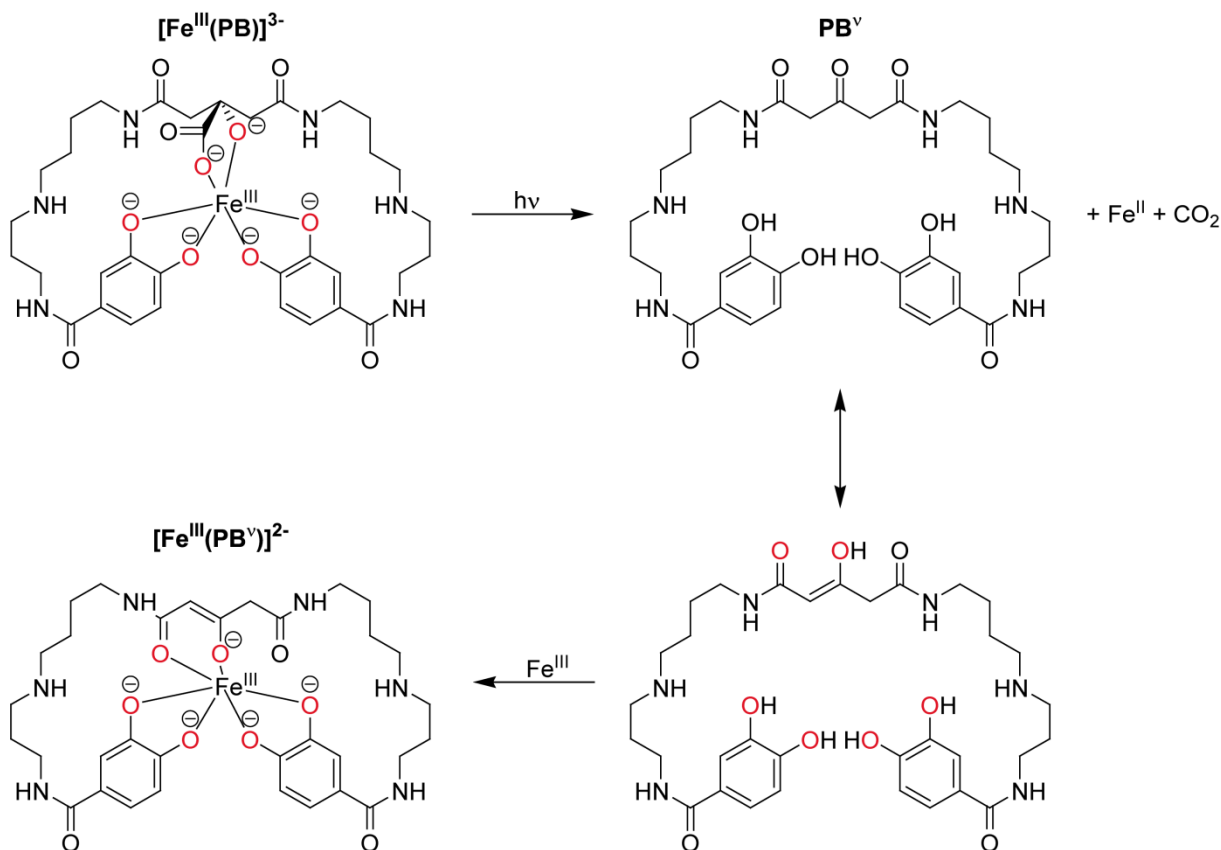
5.1.1 Vorbemerkungen

Bakterielle Aufnahmewege für endo- und exogene Siderophore sind aufgrund potentieller Angriffspunkte für neuartige antibiotische Wirkstoffe in den letzten Jahren verstärkt ins Blickfeld des akademischen und pharmazeutischen Interesses getreten. Zwar wurden bereits einige dieser Systeme charakterisiert, jedoch existieren für zahlreiche Bakterien bislang nur begrenzte Informationen über die jeweils beteiligten Importsysteme. Die Identifizierung neuer Aufnahmesysteme war bisher auf wenige Methoden beschränkt, die sich vorwiegend auf Sequenzhomologien stützten. Neben klassischen Wachstumsstudien *in vivo*, bei welchen der Phänotyp von Deletionsmutanten untersucht wurde (siehe beispielsweise Miethke *et al.* 2006^[191]), stellen biochemische Untersuchungen ausgewählter SBP *in vitro* eine weitere Methode zur Charakterisierung der Transportsysteme dar (siehe beispielsweise Zawadzka *et al.* 2009^[278]). Beide Methoden stützen sich jedoch vorwiegend auf die vorherige bioinformatische Identifizierung und Eingrenzung potentieller Kandidaten aufgrund von Sequenzhomologien bzw. eine vorherige Charakterisierung der Transporter, die abhängig vom globalen Regulator der Eisenhomöostase *Fur* sind. In dieser Arbeit wurde erstmals die direkte Identifizierung eines SBP (und in der Folge des kompletten ABC-Transporters) durch direkte Wechselwirkung mit seinem natürlichen Liganden gezeigt.

Die Auswahl von Siderophor und Organismus fiel auf Petrobactin und *Bacillus subtilis*. Petrobactin erzielte erhöhte Aufmerksamkeit durch seine Fähigkeit der Absonderung durch das angeborene menschliche Immunsystem zu entgehen. Das Protein Siderocalin vermag zwar mit Bacillibactin, Enterobactin und Carboxymycobactinen die effektivsten Siderophore von Gram-positiven, Gram-negativen und Mycobakterien zu sequestrieren, nicht jedoch PB. Dies wird vorwiegend auf das 3,4-Substitutionsmuster seiner Catechol-Einheiten zurückgeführt,^[59] man sollte jedoch auch die gänzlich andere Form und den Aufbau des Siderophors nicht außer Acht lassen. PB wurde erstmals aus dem marinen Bakterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* isoliert,^[36] wobei das 3,4-Substitutionsmuster der Catecholate erst später durch Totalsynthesen etabliert wurde.^[48,279] Neben seinem marinen Ursprung wird PB auch von wichtigen Pathogenen wie *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus* produziert, nicht jedoch von *B. subtilis*,^[38-39,75] und es wird darüberhinaus für *B. anthracis* als Virulenzfaktor angesehen.^[37,41,76]

Eine weitere wichtige Eigenschaft stellt die Photoreaktivität von PB dar,^[36] die für viele Citrat- bzw. α -Hydroxycarboxylatbasierte, marine Siderophore bekannt ist.^[280-282] Ein von der Citrateinheit ausgehender Ligand \rightarrow Metall-charge-transfer resultiert in der Decarboxylierung und Oxidation des Liganden bei gleichzeitiger Reduktion des Metalls, was zu einer 3-Ketoglutarateinheit an Stelle der vorherigen Citrateinheit führt (Schema 5-1). Das Photoprodukt ist durch Keto-Enol-Tautomerie stabilisiert und verfügt über mit dem nativen Siderophor vergleichbare Eisenbindungskonstanten.^[283]

Die Bestrahlung mit Sonnenlicht kann zwar die Reduktion von Fe^{III} zu Fe^{II} herbeiführen, nicht jedoch die Reduktion von Ga^{III} , was vermutlich auf ein höheres Redoxpotential zurückzuführen ist.^[283]



Schema 5-1: Photolyse von Petrobactin.

Die Eisen-kordinierenden Atome sind rot dargestellt.

Die Photolyse dieser marinen Siderophore dient zwar der Freisetzung von Eisen(II), allerdings ist die weitere Verteilung des reduzierten Eisens nach wie vor nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass auch die Photoprodukte der Siderophore noch eine hohe Affinität für Eisen(III) aufweisen. Eisen(II) könnte daher durch im Wasser gelösten Sauerstoff direkt wieder reoxidiert, dann von den Photoprodukten oder weiteren hochaffinen Liganden gebunden und schließlich von Bakterien aufgenommen werden.^[281] Ein wichtiges Beispiel in diesem Zusammenhang geben marine Mikroorganismen, die eng mit bestimmten Algen zusammen leben. Deren Siderophor Vibrioferrin zeigt Photolyserate die 10-20-fach höher sind als die der Siderophore von unabhängigen marinen Bakterien. Sowohl Bakterium als auch Alge zeigen deutlich erhöhte Eisenaufnahmeraten unter der Einwirkung von abgeschwächtem Sonnenlicht.^[284] Die genaue physiologische Rolle der Photoreaktivität von Siderophoren insbesondere für unabhängige marine und terrestrische Mikroorganismen bleibt allerdings unklar.^[285]

Die zuvor beschriebene Photoreaktivität von PB führte zu zusätzlichen Herausforderungen in der Versuchsausführung, da alle Experimente mit Eisen(III)-beladenem Siderophor soweit wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt werden mussten (Arbeit bei Rotlicht (629 nm)).

Zur Identifizierung eines PB-Importsystems wurde der Gram-positive Modellorganismus *B. subtilis* ausgewählt, der zwar selbst nicht pathogen ist, jedoch einen hohen Verwandtschaftsgrad zu wichtigen Pathogenen (und PB-Produzenten) wie *B. anthracis* und *B. cereus* aufweist.^[187,286-287] Darüberhinaus ist *B. subtilis* leicht zu kultivieren und genetisch zugänglich. Zu Beginn der Experimente war lediglich bekannt, dass *B. subtilis* zwar selbst kein PB produziert, es jedoch als exogenes Siderophor aufnehmen kann.^[283]

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine ähnliche siderophorbasierte Methode vorgestellt: Doorneweerd *et al.* immobilisierten Pyoverdin aus *Pseudomonas aeruginosa* auf Gold-beschichteten Glasplatten und ermöglichten so die spezifische Identifizierung des Bakteriums nach Bindung an das immobilisierte Siderophor. Der Fokus dieser Arbeit lag allerdings auf der Identifizierung des Organismus selbst und nicht eines bestimmten Transporters. Da *P. aeruginosa* auf die Pyoverdin-vermittelte Eisenaufnahme unmittelbar angewiesen ist, handelt es sich hierbei um einen „unveränderlichen Liganden“, der die selektive Erkennung des Erregers erlaubte.^[288]

5.1.2 Direkte Identifizierung eines Petrobactin-Bindungsproteins

Für die Affinitätschromatographie wurde ein Biotintag als interagierende Gruppe verwendet, um die starke Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin auszunutzen. Der Affinitätstag wurde an am sekundären Amin einer der Spermidineinheiten von PB angebracht und sollte daher einen relativ geringen Einfluss auf die Fähigkeiten zur Metallkoordination haben. Kürzlich wurde allerdings auch ein Einfluss der Aminprotonen auf die Gesamtstabilitätskonstante des Eisen(III)–Siderophor-Komplexes diskutiert. Dabei wird eine stark pH-abhängige Verteilung verschiedener Spezies angenommen.^[289] Die starke pH-Abhängigkeit wurde durch die eigenen Untersuchungen bestätigt, da nur bei $\text{pH} \geq 8.0$ eine vollständige Eisenbeladung möglich war. Weiterhin wies auch Biotinyl-PB Eisen(III)-Bindung nur bei $\text{pH} \geq 8.0$ auf, was auf ein ähnliches Koordinationsmuster hindeutet, allerdings könnte die durch den Biotintag veränderte Polarität auch eine Rolle spielen. Die Anbringung des Affinitätstags an einer der Spermidineinheiten hatte weiterhin den Vorteil, dass die Interaktion mit dem zu identifizierenden SBP weitestgehend ungestört sein sollte, da direkte Wechselwirkungen zwischen dem SBP und negativ geladenen Liganden in der Regel am Eisen(III)–Oxo-Zentrum erfolgen.^[290]

Von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Identifizierungsexperimente war die Bestimmung einer Wachstumsphase, in welcher die Expression von Eisenaufnahmesystemen möglichst hoch ist. Unter den gewählten eisenlimitierten Wachstumsbedingungen erwies sich für *B. subtilis* die späte stationäre Phase als geeignet, die für Experimente mit anderen Organismen als Startpunkt verwendet werden sollte. Nichtsdestoweniger muss davon ausgegangen werden, dass geeignete Wachstumsbedingungen für jeden untersuchten Organismus neu bestimmt werden müssen. Der Zellaufschluss in Gegenwart von 0.1% (v/v) Tween® 20 erwies sich als vorteilhaft und ausreichend, um das Protein samt Lipidanker aus der Membranfraktion zu lösen. Eine gesonderte Membranpräparation war weder notwendig noch zielführend. Als größtes Problem des Identifizierungsprozesses erwies sich die unspezifische Bindung und anschließende Coelution zahlreicher Proteine, welche sehr häufig in der Zelle vorkommen (z.B. das Chaperonin GroS). Daher

wurden freie Bindungsstellen der Matrix durch vorherige Behandlung mit konzentrierter BSA-Lösung abgesättigt, was eine deutliche Verminderung der Zahl unspezifisch gebundener Proteine zur Folge hatte. Die Reduzierung der Anzahl von Falsch-Positiven könnte durch zusätzliche experimentelle Schritte weiter verbessert werden, beispielsweise durch vorherige Fraktionierung des Zelllysats durch Ammoniumchloridfällung. Dies sollte eine zuverlässige Abtrennung von DNA, Zuckern, Lipiden, anderen Membranbestandteilen etc. gewährleisten und weiterhin zu einer Vorkonzentrierung des gesuchten Proteins führen.

Größter Nachteil der genutzten experimentellen Durchführung ist die Elution der Proteine mit konzentrierter GuHCl-Lösung, wobei nicht nur die affinitätschromatographisch, sondern auch die unspezifisch gebundenen Proteine eluiert werden. Weiterhin zieht das denaturierende Agens auch die Agarose–Streptavidin-Matrix in Mitleidenschaft. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch nach mehreren Experimenten mit derselben Säule noch erfolgreiche Identifizierungen möglich waren. Da die gewählte Synthesestrategie eine späte Einführung der Reportergruppe erlaubt, wäre die Verwendung alternativer Affinitätstags und Matrizen allerdings durchaus möglich. Die Elution mit GuHCl-Lösung stellte weiterhin ein Problem für den folgenden tryptischen Verdau dar, so dass die Proteinprobe aufwendig dialysiert und anschließend zur Volumenverkleinerung gefriergetrocknet werden musste. Der dann nötige Entsalzungsschritt stellte eine weitere mögliche Verlustquelle für Probenmoleküle dar, was sich negativ auf die Zuverlässigkeit der massenspektrometrischen Identifizierung auswirkt. In der Qualität und Sensitivität der massenspektrometrischen Geräte kann daher ein weiteres grundsätzliches Problem der Methodik bestehen: Die starke Konzentrationsabhängigkeit der Identifizierung macht den Einsatz eines hochsensitiven Massenspektrometers nötig, welches für erfolgreiche Experimente von entscheidender Bedeutung sein kann.

5.1.3 Das Petrobactin-Bindungsprotein FpiA

Nach der Identifizierung von FpiA zeigte sich, dass es Teil des *fpiBCDA*-Genclusters ist, welcher für alle nötigen Komponenten eines ABC-Transportsystems codiert. Dieses wurde bereits in früheren Arbeiten untersucht, seine Bedeutung bzw. sein genaues Substrat blieb jedoch lange unklar.^[185,191,291]

Die damals untersuchte Deletionsmutante zeigte keinen Phänotyp, da der Transporter des endogenen Siderophors Bacillibactin intakt war.^[191] Die in dieser Arbeit gezeigten Wachstumsstudien konnten hingegen die Bedeutung des Importsystems für die Aufnahme von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ zeigen. Während beide Mutanten bei Supplementierung von FeCl_3 und *apo*-BB ein erhöhtes Wachstum aufwiesen, zeigte die $\Delta\text{dhbC } \Delta\text{fpiA}$ -Doppelmutante bei Zugabe von *apo*-PB überhaupt kein weiteres Wachstum mehr. Das erhöhte Wachstum der Zellen bei Zugabe von *apo*-Siderophoren gegenüber den eisenlimitierten Bedingungen lässt sich durch die erhöhte Verfügbarkeit von Eisen erklären: Im Medium verbliebene Spuren von Eisen(III) wurden von den *apo*-Siderophoren chelatisiert und als $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB/PB})]^{3-}$ -Komplexanion in die Zelle importiert. Das vollständig zum Erliegen gekommene Wachstum der Doppelmutante bei Zugabe von *apo*-PB lässt sich mit einem inhibitorischen Effekt von *apo*-PB erklären. Das im Medium verbliebene Eisen wird von *apo*-PB als $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Komplexanion chelatisiert, kann aber von der Doppelmutante (im Gegensatz zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$) aufgrund der

fpiA-Deletion nicht mehr in die Zelle importiert werden. Die im Medium verbliebenen Eisenspuren stehen damit für die Aufnahme und das Wachstum der Zellen endgültig nicht mehr zur Verfügung. Die physiologische Relevanz von FpiA wurde in unabhängigen Studien von Zawadzka *et al.* bestätigt.^[269]

FpiA zeigt relativ große Sequenzhomologien zu den kürzlich charakterisierten SBP FatB und FpuA aus *B. cereus* und *B. anthracis*.^[55,278] Da die Sequenzhomologien von SBP im Allgemeinen eher gering sind, deuten die Werte auf einen recht hohen Verwandtschaftsgrad der Proteine hin. *In vitro*-Untersuchungen von FatB und FpuA aus *B. cereus* zeigten, dass beide Proteine zwar das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Komplexanion mit vergleichbarer Affinität binden können, nicht jedoch das Komplexanion $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ oder das des Photoprodukts $([\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB}^{\text{v}})]^{2-})$. Dieses wird von FpuA mit deutlich geringerer Affinität gebunden, was Hinweise auf unterschiedliche Substraterkennungsmodi gibt (Erkennung der 3,4-DHB-Einheiten *versus* Erkennung der Citrateinheit). Aufgrund der in dieser Studie vorgestellten Daten beschrieben die Autoren den FatB-abhängigen ABC-Transporter als das Hauptimportsystem für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ in *B. cereus*.^[278] Im Gegensatz dazu wurde für die Homologen aus *B. anthracis* *in vivo* eine umgekehrte Abhängigkeit festgestellt: Nur FpuA erwies sich als wichtig für das Wachstum unter eisenlimitierten Bedingungen und für die Virulenz des Erregers im Mausmodell, während die Deletion von *fatB* keinen signifikanten Einfluss hatte.^[55] Bei den Eigenschaften von FpiA handelt es sich demnach um eine Kombination derer von FatB und FpuA, da sowohl die physiologische Signifikanz als auch die Fähigkeit zur hochaffinen Bindung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ gezeigt werden konnte. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass *B. subtilis* über kein FpuA-Ortholog verfügt und die Ausgangssituation daher anders beurteilt werden muss.

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen von FpiA zeigten hochaffine Bindungen von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$, was durch analoge Experimente von Zawadzka *et al.* bestätigt wurde.^[269] Weiterhin wurde eine deutlich schwächere Bindung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$ beobachtet. Die Bindungsaffinität von FpiA für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$ war um etwa drei Größenordnungen geringer als die für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$, offenbar reichte diese geringe Affinität jedoch für die erfolgreiche Retardierung des Proteins an der Säulenmatrix während der Identifizierungsexperimente aus. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich die Bindungsaffinität an der Oberfläche von derjenigen in freier Lösung unterscheiden könnte. Dieser Fragestellung könnte mit Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie nachgegangen werden, bei welcher nach Immobilisierung von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{biotinyl-PB})]^{3-}$ auf Streptavidinchips und anschließender Behandlung mit einer FpiA-Lösung die Stärke der Wechselwirkung zwischen Protein und Oberflächen-immobilisiertem Liganden bestimmt werden könnte.

Die durch Fluoreszenzspektroskopie beobachtete 1:4-Stöchiometrie von Protein zu Ligand konnte in nachfolgenden Experimenten auch durch ligandenabhängige Schmelzpunktanalyse bestätigt werden. Sowohl für FpiA als auch für FatB und FpuA wurden von einer anderen Arbeitsgruppe analoge Beobachtungen bezüglich der Protein-zu-Ligand-Stöchiometrie gemacht, jedoch ohne auf diese einzugehen bzw. sie zu kommentieren.^[269,278] Eine Interpretation dieses Phänomens gestaltet sich schwierig, jedoch geben die in den massenspektrometrischen Untersuchungen gefundenen Di- und Trimere der Eisenkomplexe Hinweise auf eine multimere Struktur des Siderophors in freier Lösung.

Inwieweit die Stöchiometrie zwischen Metall und Ligand dabei eine Rolle spielt ist unklar. Mehrkernige Komplexe sind durchaus bekannt, so beispielsweise für Rhodoturolsäure (Fe_2L_3).^[13] Die Stöchiometrie zwischen Eisen(III) und Petrobactin wurde in frühen Untersuchungen als 1:1 beschrieben,^[36] allerdings könnte die Stöchiometrie auch 4:4 betragen. Nach diesem Modell würden vier Eisen(III)-Ionen von verschiedenen Teilen der vier Siderophoranionen koordiniert werden (siehe Abb. 5-1A). Eine einzelne Einheit würde nun aus diesem Gleichgewicht durch das jeweilige SBP entfernt und dem Transport in die Zelle zugeführt. In diesem Kontext zu beachten ist jedoch die hohe Affinität von PB gegenüber Eisen(III) von etwa $10^{43} \text{ L mol}^{-1}$.^[289] Ob und wie dies dem Modell entgegen steht muss ebenso wie das stöchiometrische Verhältnis noch in weiteren Experimenten genauer bestimmt werden.

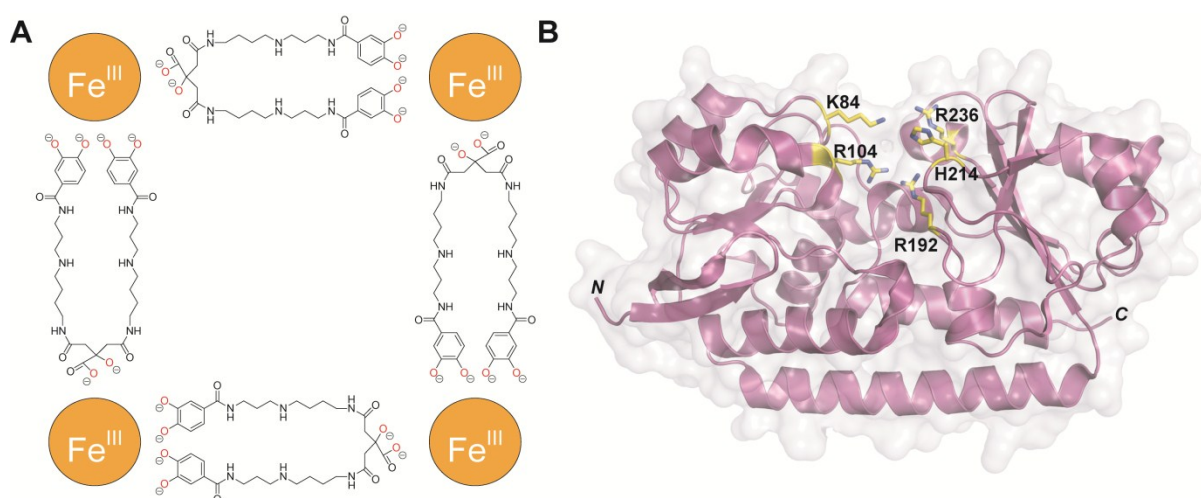


Abbildung 5-1: Modell der $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Komplexbildung und Aufnahme durch FpiA.

A) Modell eines vierkernigen Eisen(III)–Petrobactin-Komplexes. B) Kristallstruktur von FpiA (PDB-Code: 3GFV).^[269] Die Oberflächendarstellung deutet auf eine geschlossene Konformation ohne Ligandenbindung hin. Die potentiell für die Bindung verantwortlichen Reste sind als Stabmodell hervorgehoben (C: gelb, N: blau).

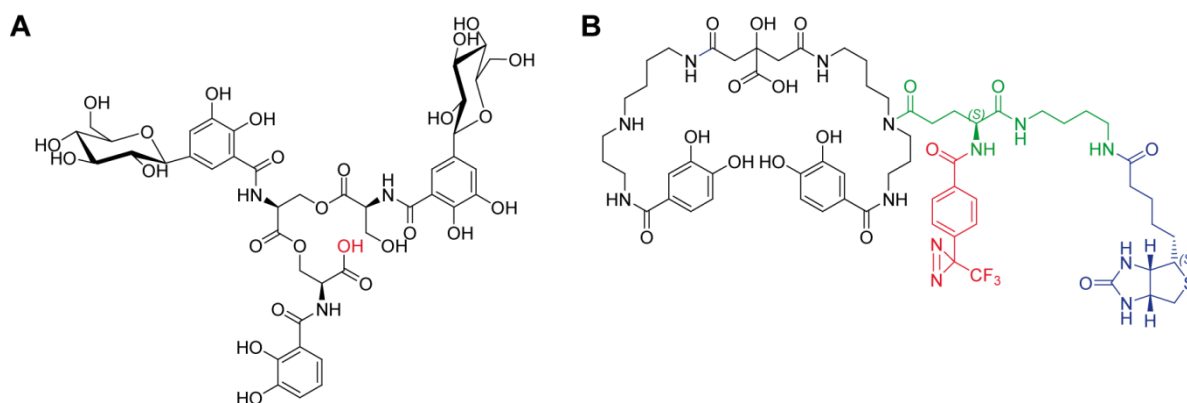
Obwohl kürzlich die Kristallstruktur des Häm-Bindungsproteins HmuT aus *Yersinia pestis* mit zwei gebundenen Häm-Komplexen veröffentlicht wurde, scheint dies eher aus der sehr flachen Struktur des Liganden zu resultieren.^[292] Häm-Bindungsproteine weisen oft eine Bindungstasche ähnlich einem „Münzeinwurfschacht“ auf, betrachtet man jedoch die Kristallstruktur von apo-FpiA dann zeigt sich, dass die Größe sowohl von Siderophor als auch von Protein nur die Bindung eines einzelnen Substratkomplexanions zulassen würden (Abb. 5-1B). Dies wird durch massenspektrometrische Untersuchungen von FpiA aus *B. subtilis* sowie FpuA und FatB aus *B. cereus* bestätigt, die jeweils einen Komplex des entsprechenden Proteins mit je einem $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{PB})]^{3-}$ -Komplexanion beobachten.^[269,278]

Bei genauerer Betrachtung der Bindungstasche von FpiA weist diese mit K84, R104, R192, H214 und R236 fünf basische Reste auf, die potentiell für die Bindung des Eisen(III)–Siderophor-Komplexanions verantwortlich sein könnten (Abb. 5-1B). Aufgrund der Sequenzhomologien zum Enterobactin-Bindungsprotein CeuE aus *Campylobacter jejuni* postulierten Zawadzka *et al.* einen Bindungsmodus unter Verwendung dieser basischen Reste sowie E107 und Y275 und damit eines

ähnlichen Protein–Ligand-Interaktionsprofils wie für Triscatecholatsiderophore.^[269] Auch die CD-Spektren des Liganden in Anwesenheit des Bindungsproteins FpiA zeigen eine ähnliche Form wie Spektren die man für Λ -konfigurierte Eisen(III)–Triscatecholatsiderophor-Komplexe erhält. Zumindest für $[\text{Fe}^{\text{III}}(3,4\text{-DHB})_3]^{6-}$ liegt daher eine ähnliche Konfiguration nahe.

5.1.4 Ausblick

Die hier erstmals verwendete Methodik der direkten Identifizierung eines SBP aus rohen Zelllysaten stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Identifizierung neuer und unbekannter SBP dar. Insbesondere Transportsysteme für neuartige Siderophore oder für Siderophore für die bislang kein System bekannt ist, wie beispielsweise modifizierte Enterobactinanaloga aus der Klasse der Salmocheline, würden interessante Ziele für weitere Experimente darstellen. Die Methode ist zwar grundsätzlich von der synthetischen Zugänglichkeit der getagten Siderophorderivate abhängig, dieses Problem lässt sich aber möglicherweise durch semisynthetische Ansätze umgehen. Ist die Isolierung und Reinigung der Siderophore ausgehend von ihren natürlichen Produzenten möglich, könnte die gewonnene Substanz als Ausgangsmaterial für die weitere chemische Modifikation dienen. Ausgehend von Salmochelin S2 sind beispielsweise Modifikationen an der hydrolysierten, ehemaligen Lactonfunktionalität möglich (Schema 5-2A).



Schema 5-2: Potentielle Siderophorderivate für zukünftige Identifizierungsexperimente.

A) Salmochelin S2. Ein potentieller Anknüpfungspunkt für Reportergruppen ist rot hervorgehoben. B) Mit Photocrosslinker und Biotintag derivatisiertes PB. Der Linker ist in grün, der Biotintag in blau und die photoaktive Gruppe in rot gezeigt.

Desweiteren sollte die späte synthetische Kupplung des Affinitätstags auch die Einführung anderer Reportergruppen, wie beispielsweise Fluoreszenzlabels oder photoaktiver Gruppen ermöglichen. Während sich mit Fluoreszenzlabels Siderophore nach Eintritt in die Zelle verfolgen lassen könnten, würden photoaktive Gruppen durch irreversible Quervernetzung mit dem Zielprotein eine alternative Methode zur affinitätschromatographischen Identifizierung darstellen. Ein solches, derzeit in der Arbeitsgruppe Dr. Oberthür synthetisiertes Molekül, ist in Schema 5-2B gezeigt. Ein Vorteil dieser Methode wäre, dass die Arbeit bei Normallicht möglich wäre, da die Photolyse des Siderophors nach der Quervernetzung mit dem Protein nicht mehr ins Gewicht fällt. Die Arbeit bei Normallicht mit anderen photoreaktiven Siderophoren, wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurde, könnte

möglicherweise durch Substitution von Eisen(III)- mit Gallium(III)-Ionen erzielt werden, die zumindest im Fall von Petrobactin eine Photoreaktion verhindernen.^[283]

5.2 Das Triscatecholatsiderophor-Bindungsprotein FeuA und seine Substrate Bacillibactin, Enterobactin und mecam

5.2.1 Strukturelle Eigenschaften von FeuA

Das Triscatecholatsiderophor-Bindungsprotein FeuA nimmt die klassische Faltung von Substratbindungsproteinen der Klasse III ein: Die *N*- und *C*-terminale Domäne sind über eine einzelne, lange α -Helix miteinander verbunden und die zwei Domänen weisen jeweils eine Rossmann-ähnliche Faltung auf. Die Klasse III der SBP kann weiter unterteilt werden, nämlich in TroA-, FhuD- bzw. ShuT-ähnliche Proteine.^[290] Die Unterscheidung begründet sich zum einen auf ihren verschiedenen Substraten (Metallionen/Vitamin B₁₂ und Siderophore/Häm) und zum anderen auf den damit verbundenen Topologien. TroA-ähnliche SBP für Metallionen nehmen oftmals eine zweizählige Pseudosymmetrie bezogen auf die Domänen ein, außerdem ist die verbindende α -Helix zwischen den Domänen typischerweise etwas länger. Vergleicht man die Art der Ligandenbindung, so lassen sich deutliche Unterschiede in der Tiefe der Bindungstasche ausmachen. Während die TroA-ähnlichen SBP ihre Substrate vollständig bedecken (Abb. 5-2D), ist dies für FhuD-ähnliche SBP nicht der Fall. Siderophore werden nur teilweise bedecken und wirken oft bei der Ausbildung der Gesamtoberflächenstruktur des Komplexes mit (Abb. 5-2B). ShuT-ähnliche SBP zeigen wiederum ein anderes Bindungsmuster, was in der flachen Natur ihrer Hämliganden begründet ist. Die Bindungstasche bildet eine „Münzeinwurfschacht“-ähnliche Form in welcher der flache Ligand gebunden wird (Abb. 5-2F).

Die ersten ca. 20 AS des reifen Proteins wiesen keine definierte Faltung auf, was für SBP nicht untypisch ist. Bei SBP Gram-positiver Organismen stellt der *N*-Terminus die Stelle der Membranverankerung dar, ein flexibler *N*-terminaler Teil kann daher der nötigen Beweglichkeit des verankerten Proteins oberhalb der Cytoplasmamembran zugeschrieben werden. In diesem Kontext ist auch die Präsenz des β 1- β 2-Faltblatts am *N*-Terminus von Interesse. Dieses tritt nur in wenigen der bisher strukturell charakterisierten SBP der Klasse III auf und interessanterweise ausschließlich unter den FhuD-ähnlichen Proteinen (siehe Anhang, Tab. A-5). Die genaue strukturelle und funktionelle Bedeutung dieses vorgelagerten β -Faltblatts ist unklar. In einigen Strukturen bildet das Faltblatt Kristallkontakte aus, wie beispielsweise in der *apo*-FeuA-Struktur. Die Häufung dieses Sekundärstrukturmotivs in verschiedenen Kristallstrukturen und die Tatsache, dass nicht immer Kristallkontakte vorliegen (oder nur sehr wenige wie beispielsweise in den *holo*-FeuA-Strukturen) spricht allerdings dafür, dass es sich nicht um ein reines Kristallisationsartefakt handelt. Möglicherweise spielen das β -Faltblatt und die Häufung der es ausbildenden hydrophilen Reste eine funktionelle Rolle bei der Erkennung der TMD oder der Wanderung des Proteins entlang der Cytoplasmamembran.

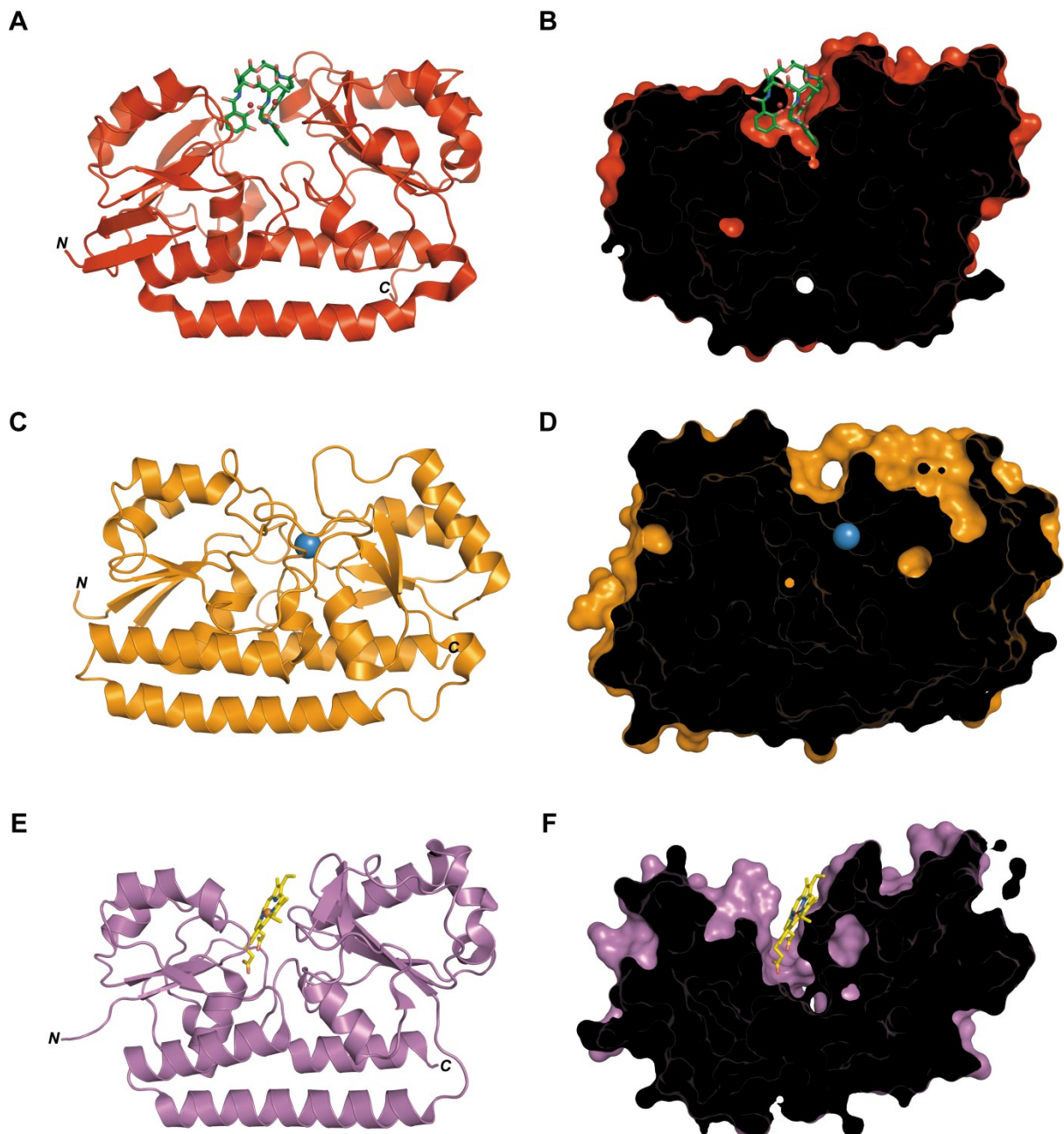


Abbildung 5-2: Strukturelle Unterschiede der Ligandenbindung der Klasse III-SBP-Subtypen.

A) und B) FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻. C) und D) MtsA·Fe^{II} aus *Streptococcus pyogenes* (PDB-Code: 3HH8).^[169] E) und F) IsdE·Häm aus *Staphylococcus aureus* (PDB-Code: 2Q8P).^[293] Links ist jeweils das Protein, rechts ein Schnitt durch die Proteinoberfläche gezeigt.

Die bei Substratbindung beobachtete Domänenkippbewegung in FeuA von etwa 20° ist die bisher größte experimentell beobachtete Konformationsänderung in einem SBP der Klasse III. Diesen wurde bisher eine deutlich geringere Domänenbewegung zugeschrieben als SBP der Klassen I und II, da angenommen wurde, dass die die Domänen verknüpfende α -Helix Rigidität in die Struktur induziert.^[126,154] Obwohl bereits Molekulardynamiksimulationen nahelegten, dass die Starrheit der Strukturen möglicherweise auf Restriktionen der Kristallpackung zurückgeht,^[157,160-161] zeigte erst die Struktur des Siderophorbindungsproteins FitE aus *Escherichia coli*, dass selbst im *apo*-Zustand offene

und geschlossenene Formen mit teilweise erheblichen konformationellen Unterschieden existieren können.^[155] Die beobachtete konformationelle Flexibilität von FeuA könnte aufgrund von Restriktionen der Kristallpackung beschränkt und *in vitro* noch größer sein. Es stellt sich weiterhin die Frage des Einflusses der Länge der verbrückenden α -Helix auf die Domänenbewegung. Während TroA-ähnliche SBP über Helixlängen von etwa 25 AS-Resten verfügen, weisen FhuD-ähnliche SBP Längen von etwa 20 AS-Resten auf.^[290] Möglicherweise verleiht die längere Helix den TroA-ähnlichen SBP eine höhere Rigidität verglichen mit den FhuD-ähnlichen, da sie mit Metallionen deutlich kleinere Substrate binden und daher keinen Zwang zu großer konformationeller Flexibilität haben. Diese könnte im Gegenteil zu einer schwächeren Bindung der Metallionen führen, da eine deutlich geöffnete Bindungstasche unter Umständen solvensbedingt thermodynamisch stabilisiert wäre und eine Gleichgewichtsverschiebung zur *holo*-Form erschweren würde. In diesem Kontext ist auch die „Kollabierung“ der Bindungstasche von *apo*-TroA, verglichen mit seiner *holo*-Form, zu sehen: Während andere SBP der Klasse III bei Verlust des Substrates eine offenere Konformation einnehmen schließt sich TroA bei Verlust seines Liganden. Das verwandte Zink(II)-Bindungsprotein ZnuA aus *E. coli* zeigte hingegen das „normale“ Verhalten von SBP, daher ist unklar ob es sich bei der TroA-Bindungstasche um ein physiologisch relevantes Phänomen oder um ein Kristallisationsartefakt handelt. Die Rigidität der TroA-ähnlichen SBP könnte desweiteren auch mit der größeren Interaktionsfläche zwischen verbrückender α -Helix und den beiden Domänen zusammenhängen. Die Verschiebung des Gleichgewichts von der *apo*-Form zur *holo*-Form von FeuA wurde weiterhin durch ligandenabhängige Schmelzpunktanalyse untersucht. Diese zeigte eine signifikante Stabilisierung der Proteinfaltung durch verschiedene Liganden. Die drei mit hoher Affinität gebundenen Liganden $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ wiesen dabei alle eine vergleichbare Stabilisierung auf.

Der Domänenbewegung kommt eine so große Bedeutung zu, da auf sie die Erkennung des SBP durch seine kognaten TMD zurückgeführt wird. Die nahezu gleiche Domänenbewegung in allen drei FeuA-Cokristallstrukturen impliziert die Bedeutung der Reste E90 und E221, die in SBP der Klasse III hochkonserviert sind. In Abb. 5-3 ist ein multipler Sequenzvergleich bekannter Triscatechol-Bindungsproteine dargestellt. Während die als Bindungsmotiv fungierende basische Triade in CeuE aus *C. jejuni*, FepB aus *E. coli* sowie VctP und ViuP aus *Vibrio cholerae* nicht konserviert ist, sind die aciden Reste E90 und E221 von FeuA, die für die Interaktion mit der Transmembranpermease FeuBC verantwortlich sein können, stark konserviert (weiterhin wurde das SBP FpiA aus *B. subtilis* untersucht, welches das gemischte Catechol–Citrat–Siderophor Petrobactin bindet).

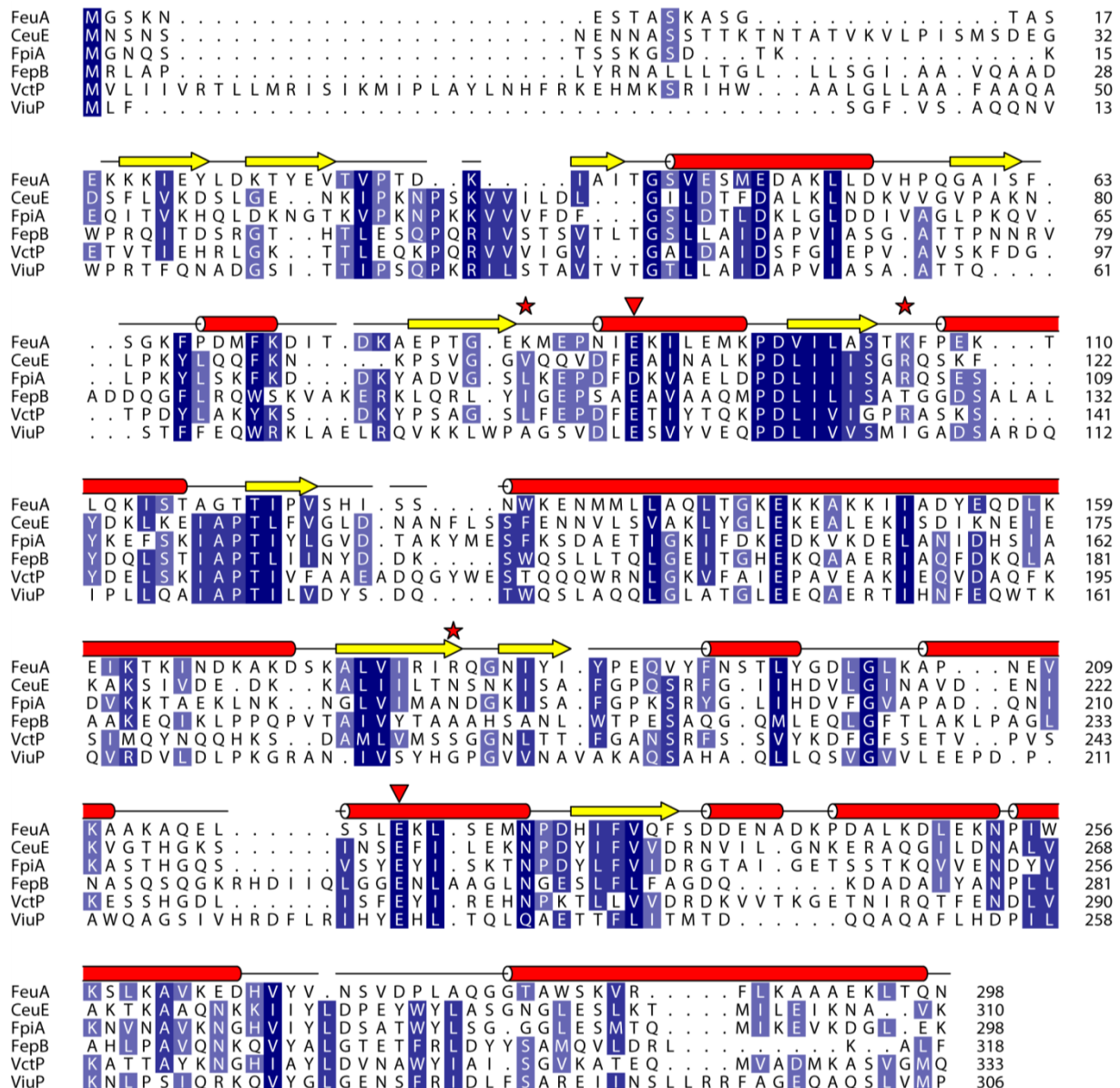


Abbildung 5-3: Multipler Sequenzvergleich von Triscatecholatsiderophor-Bindungsproteinen.

Die Sequenzen von FeuA (*B. subtilis*), CeuE (*C. jejuni*), FpiA (*B. subtilis*), FepB (*E. coli*), VctP und ViuP (beide *V. cholerae*) wurden mit dem Programm T-Coffee verglichen.^[267] Die Sekundärstrukturelemente sind durch rote Zylinder (α-Helix) und gelbe Pfeile (β-Strang) angedeutet und beziehen sich auf FeuA. Sterne zeigen die Positionen der basischen Triade von FeuA, Dreiecke zeigen die Positionen der Glu-Reste, die höchst wahrscheinlich mit den TMD interagieren. Die Abbildung wurde mit dem Programm ALINE erstellt.^[245] Die Zugriffscores, sowie die Verwandtschaftsgrade der analysierten Proteine sind im Anhang, Tab. A-6 angegeben.

In beiden Domänen ist eine Sequenz konserviert, die jeweils den hydrophoben Kern der Domäne ausbildet (Sequenz: PDXIXXX, X steht jeweils für eine hydrophobe AS). Diese sind für FhuD-ähnliche SBP bekannt.^[294]

Die Bedeutung dieser Reste wurde für die SBP FhuD2 aus *Staphylococcus aureus* sowie FecB und BtuF aus *E. coli* experimentell bereits gezeigt,^[163,166-167] daher liegt die Vermutung einer ähnlichen Bedeutung für die in FeuA ebenfalls konservierten Reste nahe. Die nahezu identische Domänenbewegung bei Bindung der verschiedenen Substrate $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ lässt vermuten, dass die Abstände zwischen den konservierten Glutamatresten bzw.

deren genaue Positionen von großer Wichtigkeit für die erfolgreiche Erkennung durch die Transmembranpermease FeuBC sind. Die entsprechenden positiv geladenen Reste, vermutlich R59 in FeuB und R53 in FeuC sind ebenfalls hoch konserviert (siehe Abb. 5-4).

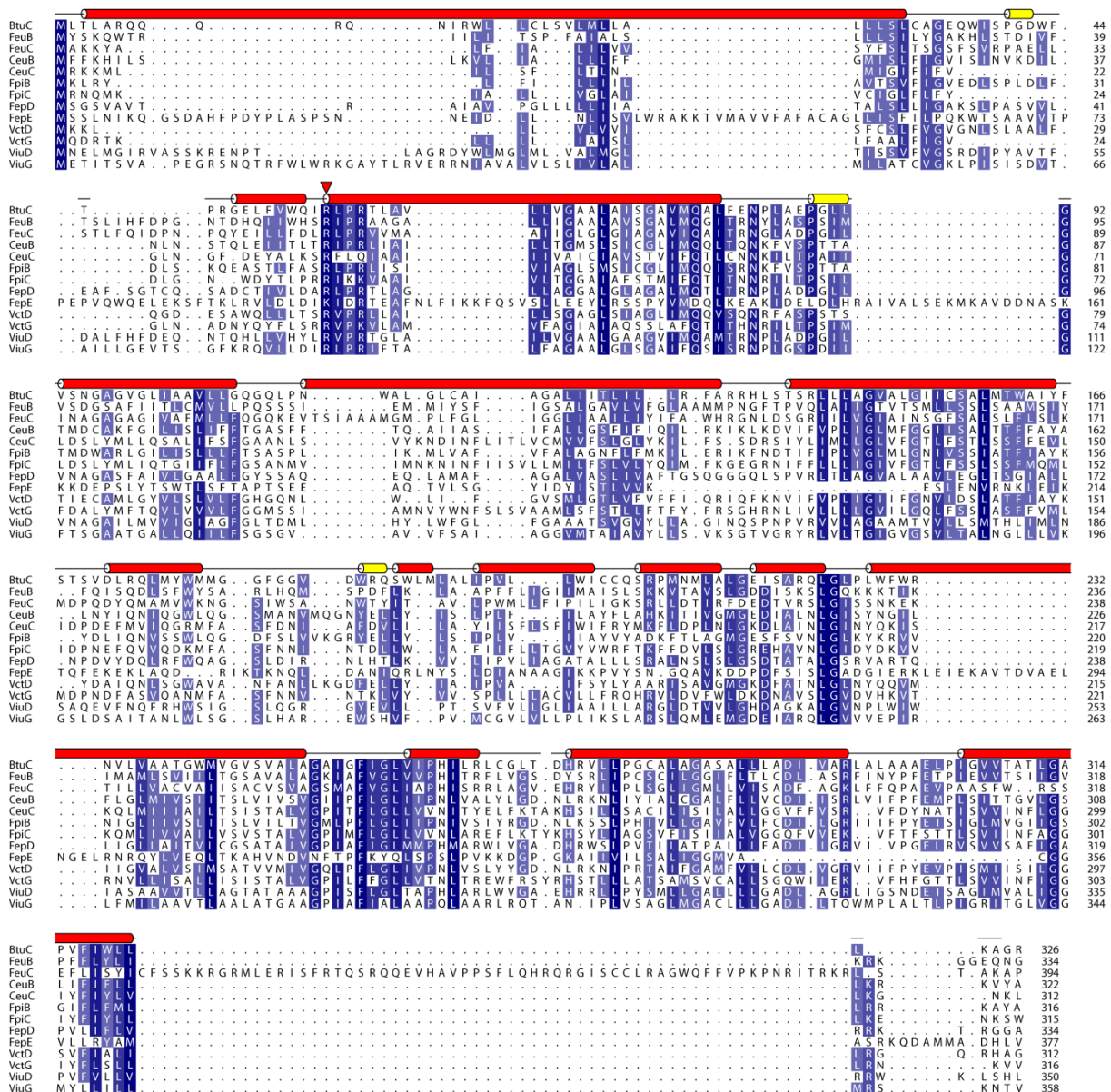


Abbildung 5-4: Multipler Sequenzvergleich der Transmembrandomänen von Trisaccholat-ABC-Transportern.

Die Sequenzen von BtuC (*E. coli*), FeuB und FeuC (*B. subtilis*), CeuB und CeuC (*C. jejuni*), FpiB und FpiC (*B. subtilis*), FepD und FepG (*E. coli*), VctD und VctG sowie ViuD und ViuG (alle *V. cholerae*) wurden mit dem Programm T-Coffee abgeglichen.^[267]

Die Sekundärstrukturelemente sind durch rote und gelbe Zylinder (α-Helix bzw. 3/10-Helix) angedeutet und beziehen sich auf BtuC. Dreiecke zeigen die Positionen der Arg-Reste, die höchst wahrscheinlich mit den SBP interagieren. Die Abbildung wurde mit dem Programm ALINE erstellt.^[245] Die Zugriffscores, sowie die Verwandtschaftsgrade der analysierten Proteine sind im Anhang, Tab. A-7 angegeben.

Tabelle 5-1: Abstände zwischen den konservierten Glutamatresten strukturell charakterisierter Substratbindungsproteine in offener und geschlossener Konformation.^[a]

Protein (Organismus)	offene Struktur	geschlossene Struktur	Reste
BtuF (<i>E. coli</i>)	46.2 Å (1N4D, Kette A)	45.7 Å (1N4A, Kette A)	E72, E202
	47.9 Å (1N4D, Kette B)	46.2 Å (1N4A, Kette B)	
	51.3 Å (2QI9)		
FeuA (<i>B. subtilis</i>)	48.5 Å	44.4 Å ([Fe^{III}(BB)]³⁻) 43.7 Å ([Fe^{III}(Ent)]³⁻) 44.5 Å ([Fe^{III}(mecam)]³⁻)	E90, E221
FitE (<i>E. coli</i>)	52.6 Å (3BE5, Kette A)		E102, E231
	54.4 Å (3BE5, Kette B)	47.6 Å (3BE5, Kette C)	
	53.7 Å (3BE5, Kette D)	46.8 Å (3BE6, Kette C)	
	54.4 Å (3BE6, Kette A)	47.6 Å (3BE6, Kette D)	
	53.6 Å (3BE6, Kette B)		
HmuT (<i>Y. pestis</i>)	46.6 Å (3MD9, Kette A)	44.9 Å (3NU1, Kette A)	E77, E206
	48.4 Å (3MD9, Kette B)	44.1 Å (3NU1, Kette B)	
HtsA (<i>S. aureus</i>)	48.3 Å (3EIW)	45.6 Å (3LI2, Kette A, B)	E110, E250
	48.5 Å (3EIX)	48.0 Å (3LHS)	
SirA (<i>S. aureus</i>)	48.0 Å (3MWG, Kette A)	46.1 Å (3MWF)	E109, E245
	47.7 Å (3MWG, Kette B)		

[a] Die Abstände beziehen sich jeweils auf die C_α-Atome.

Offene bzw. geschlossene Struktur beziehen sich nicht notwendigerweise auf *apo*- und *holo*-Form, auch wenn dies meist der Fall ist. Mittlerweile sind Beispiele für *apo*-Proteine in geschlossener Konformation und *holo*-Proteine in offener Konformation bekannt. Vergleiche hierzu auch die Übersicht von Berntsson *et al.*^[142]

Wie die unterschiedlichen Abstände zwischen den konservierten Glu-Resten in *apo*- bzw. *holo*-Form ausgebildet werden, scheint dabei zweitrangig zu sein. So finden sich distinkte Abstände sowohl in FeuA mit seiner großen Domänenbewegung als auch in BtuF mit einer deutlich geringeren Domänenbewegung oder HtsA und SirA mit isolierten Bewegungen einzelner Loops. Die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Kristallstrukturen zeigt jedoch bereits die konformationelle Flexibilität sowohl der geschlossenen als auch der offenen Form, daher können die aus Kristallstrukturen ermittelten Abstände nicht als Absolutwerte für eine Interaktion oder Nicht-Interaktion mit den TMD gelten. Ein direkter Vergleich ist weiterhin wegen der verschiedenen Genauigkeiten der Abstände bedingt durch die unterschiedlichen Auflösungen der Kristallstrukturen nicht möglich. Die Abstände der konservierten Glu-Reste der derzeit zur Verfügung stehenden SBP in offener und geschlossener Konformation sind in Tab. 5-1 angegeben.

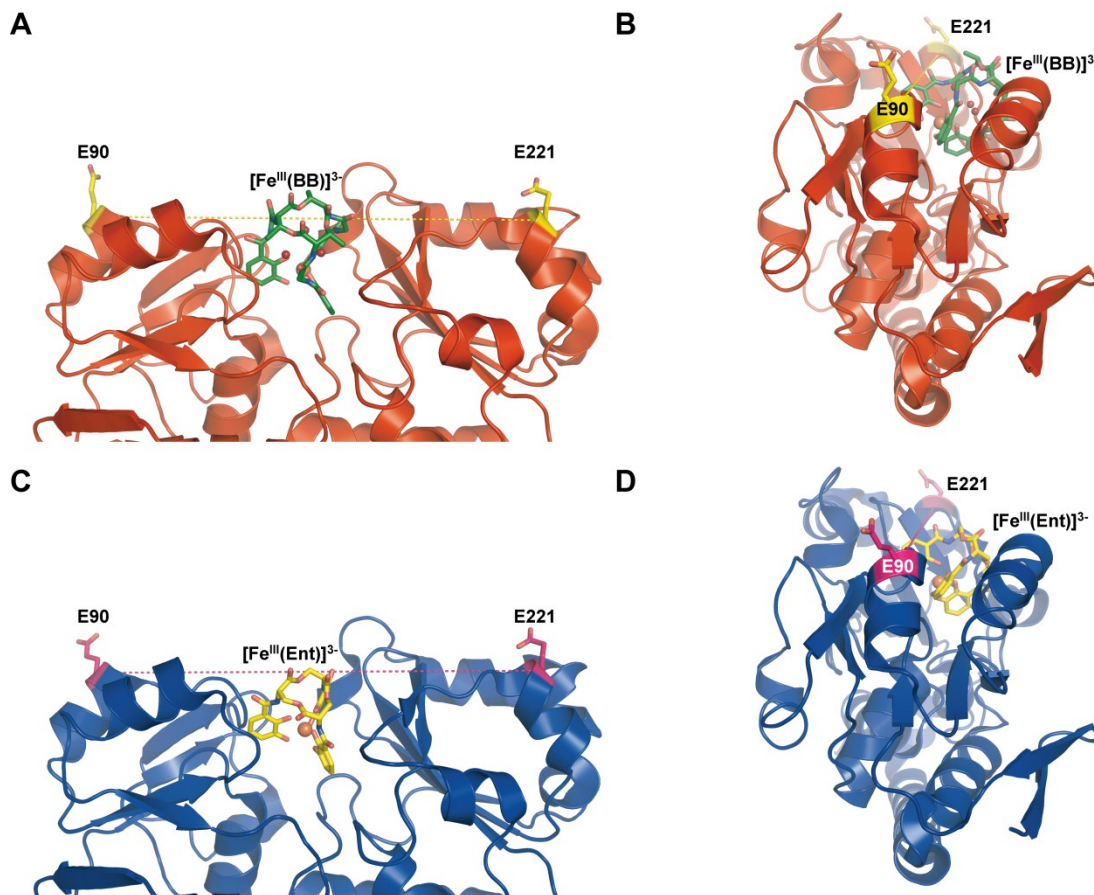


Abbildung 5-5: Putative Interaktionsoberfläche von FeuA mit den Transmembrandomänen FeuBC.

A) und B) $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. C) und D) $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$. E90 und E221 sind jeweils als Stabmodell hervorgehoben (C: gelb bzw. pink, O: rot). Die Verbindung zwischen den Glu-Resten ist jeweils durch eine gleichfarbige Linie dargestellt.

Der kristallographisch bestimmte Abstand von etwa 4 Å zwischen *apo*- und *holo*-Struktur von FeuA entspricht etwa der Ganghöhe von drei Resten in einer α -Helix (4.5 Å). Eine gewisse strukturelle bzw. konformationelle Flexibilität der beteiligten Reste vorausgesetzt, wäre die Entwicklung eines Protein-basierten Inhibitors der bakteriellen Siderophoraufnahme denkbar. Durch Substitution eines von E90 bzw. E221 um drei Positionen entfernten Restes durch Glutamat könnte eine *apo*-FeuA-Variante den *holo*-Zustand des Proteins gegenüber den Transmembrandomänen des ABC-Transporters mimikrieren und den Transporter auf diese Weise blockieren. Allerdings ist fraglich ob die Erkennung des *holo*-Zustands im Falle der FhuD-ähnlichen SBP ausschließlich über die konservierten Glutamatreste erfolgt oder ob eine größere Interaktionsfläche gebildet wird, an der beispielsweise auch das Substrat beteiligt sein könnte. Zwar sind die natürlichen Substrate BB und Ent unterschiedlich groß und formen daher unterschiedliche Interaktionsflächen, allerdings weisen die Carbonylgruppen beider Trilactonringe in dieselbe Richtung und nehmen sehr analoge Positionen ein (Abb. 5-5). Daher könnten beide Siderophore mit den TMD wechselwirken, wenn auch vermutlich unterschiedlich stark. Für das Modell der Substraterkennung durch den Transporterkomplex sprechen Simulationen des Vitamin B₁₂-Transporters BtuC₂D₂F, in welchen *holo*-BtuF eine offene Konformation des Transporters stabilisiert, allerdings nur solange das Substrat Vitamin B₁₂ anwesend ist.^[295]

Ein deutlich einfacherer Weg zur Herstellung eines potenten Inhibitors wäre indess die Herstellung einer FeuA-E90A-E221A-Variante, die über vergleichbare Affinitäten gegenüber den Siderophoren verfügen, aber zu Interaktionen mit dem TMD nicht fähig sein sollte.^[163,166-167] Diese FeuA-Variante könnte im Überschuss das native Protein kompetitiv inhibieren. SBP sollten für derartige Anwendungen grundsätzlich geeignet sein, da sie sehr gut löslich, äußerst hitzestabil, hoch konzentrierbar ($> 100 \text{ mg mL}^{-1}$) und einfach in großen Mengen zu produzieren sind.

5.2.2 Bindungsmodus von FeuA

Als Hauptbindungsmotiv für verschiedene Triscatecholatsiderophore konnte in dieser Arbeit eine basische Triade, bestehend aus K84 und K105 von der N-terminalen Domäne und R180 von der C-terminalen Domäne von FeuA ausgemacht werden. Diese bindet das jeweilige Substrat hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen nach Interkalation zwischen die Catecholateinheiten. Die basische Triade ist strukturell in verschiedenen Triscatecholatsiderophor-bindenden Proteinen durchaus konserviert. So wird das Triscatecholatsiderophor-Mimetikum mecamin in Komplex mit dem Enterobactin-Bindungsprotein CeuE aus *C. jejuni* durch eine basische Triade bestehend aus R117, R204 und R248 gebunden (Abb. 5-11).^[99] Auch das strukturell nicht verwandte Protein Siderocalin des angeborenen menschlichen Immunsystems zeigt eine basische Triade bestehend aus R81, K125 und K134. Die Bindung geht in diesem Fall allerdings über rein elektrostatische Wechselwirkungen hinaus und wird durch hybride elektrostatische/Kation- π -Wechselwirkungen ausgeführt (Abb. 5-6B).^[58,62] Bei Lipocalin Q83 aus der Japanwachtel (*Coturnix japonica*) findet sich ebenfalls eine basische Triade bestehend aus den Resten K83, R102 und R113.^[67] Weiterhin ist die Struktur des Petrobactin-bindenden Proteins FpiA bekannt, welche zahlreiche basische Reste an den Domänengrenzflächen aufweist, die potentiell an der Bindung des Catecholat-Citrat-Siderophors beteiligt sind (Abb. 5-1B).^[269] Beim in Abb. 5-3 gezeigten multiplen Sequenzvergleich Triscatecholatsiderophor-bindender Proteine zeigt sich, dass die basische Triade auf der Sequenzebene nicht konserviert ist, was im Gegensatz zu ihrer starken Konservierung auf der strukturellen und funktionellen Ebene, ebenso wie zur starken (Sequenz-) Konservierung der höchstwahrscheinlich mit den TMD interagierenden AS-Reste E90 und E221 steht.

Die Bindungstasche von FeuA weist aufgrund ihrer basischen Triade eine positiv geladene Umgebung aus, diese ist jedoch deutlich weniger ausgeprägt als im Siderophorfänger Siderocalin (Abb. 5-6A und B). Im Allgemeinen spiegelt der Ladungszustand der Bindungstasche die chemischen Charakteristika der potentiellen Substrate wider. Die verbleibende dreifach negative Ladung der Komplexanionen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecamin})]^{3-}$ wird durch die basische Triade von FeuA ausgeglichen, analoges gilt für Siderocaline und CeuE aus *C. jejuni*.^[58,67,99] Die stärker negativ geladenen Eisenkomplexe der Carboxylatsiderophore Staphyloferrin A und B werden in Bindungstaschen mit höherer Anzahl positiv geladener Reste untergebracht (Abb. 5-6C),^[156,159] während Hydroxamatsiderophore in der weitgehend neutralen, mit aromatischen Resten ausgestatteten Bindungstasche von FhuD ihren Platz finden (Abb. 5-6D).^[84,126] Der Ladungszustand allein kann jedoch für die Bindung nicht ausschlaggebend sein, da von den SBP auch eisenfreie Siderophore mit hoher Affinität gebunden werden, welche deprotoniert eine deutlich höhere negative Ladung aufweisen.

Der physiologische Nutzen dieser Bindung ist nicht ganz klar, möglicherweise dient sie zur Vorkonzentration des Siderophors nahe der Membran. Eine andere mögliche Funktion besteht in der Regulation des Siderophorhaushalts der Zelle. So ist beispielsweise der Transkriptionsregulator Btr aus *B. subtilis* in der Lage sowohl eisenbeladenes als auch unbeladenes BB zu binden. BB wirkt in diesem Fall als Induktor, der die Bindung des Aktivators Btr an die DNA ermöglicht, was in der Folge zur Transkription der *feuABC*-Transportergene durch die RNA-Polymerase führt.^[192]

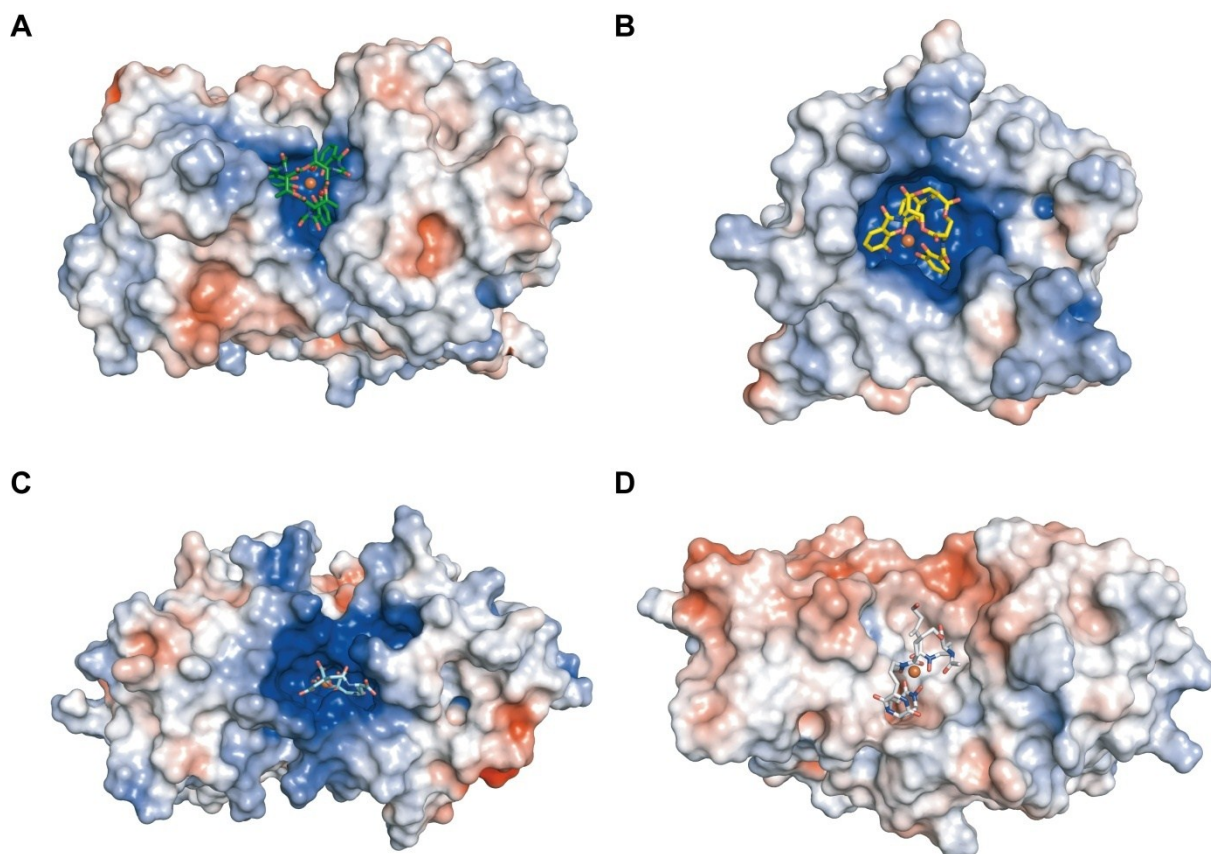


Abbildung 5-6: Vergleich der elektrostatischen Eigenschaften verschiedener Siderophorbindungsproteine.

A) FeuA-[Fe^{III}(BB)]³⁻ aus *B. subtilis*. B) Siderocalin-[Fe^{III}(Ent)]³⁻ aus *Homo sapiens* (PDB-Code: 3CMP). C) HtsA-[Fe^{III}(SA)]⁴⁻ aus *S. aureus* (PDB-Code: 3LI2).^[156] SA: Staphyloferrin A. D) FhuD-[Fe^{III}(Coprogen)] (PDB-Code: 1ESZ).^[84] Gezeigt ist jeweils die elektrostatische Oberfläche des Proteins von -5 (rot) bis +5 (blau) $k_B T/e_c$. Alle Bilder wurden mit dem PyMOL-Plugin APBS erstellt.^[246] Die Liganden sind als Stabmodell dargestellt (C: grün/gelb/türkis/grau, N: blau, O: rot, Fe: orange, H₂O: dunkelrot).

SBP der Klasse III weisen eine Besonderheit gegenüber solchen der Klassen I und II auf: Das gebundene Substrat wird durch in der Regel geringere Konformationsänderungen weit weniger stark vom Protein bedeckt. Die Cokristallstruktur von FhuD und Albomycin δ_2 weist beispielsweise keinerlei Wasserstoffbrückenbindungen oder sonstige Wechselwirkungen des Proteins mit der antibiotisch wirksamen Einheit auf.^[84] Auch FeuA bindet Siderophore im Wesentlichen durch Wechselwirkungen mit ihren Eisen(III)-Oxo-Zentren, daher bietet sich das Rückgrat des jeweiligen Siderophors (bei FeuA im Speziellen der Trilactonring) für Modifikationen mit antibiotisch wirksamen Gruppen an.

Die Affinitäten von FeuA gegenüber seinen natürlichen Substraten $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ liegen im mittleren nanomolaren Bereich, wie auch die Affinität des FeuA-Homologen FepB aus *E. coli*.^[296] Grundsätzlich weisen die Affinitäten von homologen SBP Gram-positiver und Gram-negativer Organismen gegenüber den gleichen Siderophoren allerdings oftmals Unterschiede von mehreren Größenordnungen auf. So binden FhuD1 und FhuD2 aus dem Gram-positiven *S. aureus* Hydroxamatsiderophore mit einer Affinität im mittleren nanomolaren Bereich,^[162-163] das homologe FhuD aus dem Gram-negativen *E. coli* allerdings mit um etwa zwei Größenordnungen geringerer Affinität.^[297] Die beobachtete Wechselwirkung von FhuD mit TonB und die Bildung eines ternären Komplexes dieser Proteine mit dem äußeren Membrantransporter FhuA in *E. coli* legen allerdings nahe, dass durch die direkte Positionierung des SBP am äußeren Membrantransporter in Gram-negativen Organismen keine Notwendigkeit für eine hochaffine Bindung mehr besteht.^[127] Die deutlich höheren Affinitäten der SBP Gram-positiver Bakterien spiegeln hingegen ihre Position an der Zelloberfläche wider, da sie in direkter Konkurrenz zu den hochaffinen äußeren Membrantransportern Gram-negativer Organismen stehen.

Nichtsdestoweniger scheinen sich die SBP hinsichtlich ihrer Affinität und Promiskuität zu unterscheiden. Während manche SBP ganze Klassen von Siderophoren binden (wie beispielsweise FhuD Hydroxamatsiderophore), sind andere hochspezialisiert. So binden die Proteine HtsA und SirA aus *S. aureus* beispielsweise die Siderophore Staphyloferrin A bzw. B mit Affinitäten im unteren nanomolaren Bereich, sind jedoch absolut spezifisch für ihr jeweiliges Siderophor.^[156,159] Die Hydroxamatsiderophor-Bindungsproteine desselben Organismus, FhuD1 und FhuD2, binden hingegen eine ganze Bandbreite exogener Siderophore, allerdings mit Affinitäten im mittleren bis hohen nanomolaren Bereich.^[162-163] In diesem Fall wurde die hohe Affinität für eine breiter angelegte Spezifität gegenüber exogenen Siderophoren „geopfert“, was in den unterschiedlichen Habitaten begründet sein könnte, in denen das Pathogen erfolgreich ist. FeuA liegt zwischen diesen beiden Extremfällen, da es einerseits recht hohe Affinitäten für seine Substrate aufweist, andererseits aber seine Promiskuität in Grenzen hält, da sich die Bindung auf die jeweils gleichen Teile von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ konzentriert und es beispielsweise $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ nicht zu binden vermag.

Die teilweise eher geringen Affinitäten der SBP gegenüber ihren Substraten (beispielsweise verglichen mit dem Siderophorfänger Siderocalin) lassen sich zum einen dadurch erklären, dass die Substrate während des Transportprozesses wieder aus der Bindungsspalte herausgelöst werden müssen. Im Falle von Cofaktoren wie Häm kommt weiter hinzu, dass die SBP-gebundenen Substrate keine katalytische Funktion erfüllen müssen, daher ist eine schwächere Bindung in diesem Falle tolerierbar.^[293,298]

Versuche, einen Zusammenhang zwischen der Affinität/Spezifität der SBP mit der Tiefe ihrer jeweiligen Bindungstaschen unter Berücksichtigung ihrer Gram-positiven/-negativen Herkunft herzustellen, sind äußerst schwierig. Erste Betrachtungen bekannter Strukturen erwecken den Eindruck, dass SBP Gram-positiver Bakterien tiefere Bindungstaschen besitzen, die mit ihrer höheren Affinität korrelieren: Die *apo*-Struktur von FhuD aus *B. subtilis* (PDB-Code: 3G9Q) weist eine deutlich tiefere Bindungsspalte auf als die *holo*-Struktur aus *E. coli* (PDB-Codes: 1EFD, 1KS7, 1K2V, 1ESZ),

gleiches gilt für die *apo*- und *holo*-Strukturen von FeuA verglichen mit der *holo*-Struktur von CeuE aus *C. jejuni* (PDB-Code: 2CHU). Allerdings richtet sich die Gestalt der Bindungstaschen vorwiegend nach der Größe ihrer Substrate, daher nehmen sie für flache Liganden wie beispielsweise Häm deutlich andere Formen an als für große, eher globuläre Liganden wie Vitamin B₁₂ oder Siderophore (Abb. 5-2). Die Anzahl der verfügbaren Strukturinformationen von *apo*- bzw. *holo*-SBP lässt eine grundsätzliche These derzeit nicht zu. Die Präsenz sowohl offener wie geschlossener *apo*- und *holo*-Formen in Kristallstrukturen wie beispielsweise im Fall des Proteins FitE aus *E. coli* und eine manuelle Untersuchung der zurzeit verfügbaren Kristallstrukturen (siehe Anhang, Tab. A-4) legen jedoch nahe, dass der Grundsatz tieferer Bindungstaschen in SBP Gram-positiver Organismen zu stark vereinfacht und durch die momentan zur Verfügung stehenden Strukturen von SBP der Klasse III nicht gedeckt ist.

5.2.3 Charakteristika der gebundenen Siderophore

Die Kristallisation von SBP in Komplex mit ihren jeweiligen Substraten bietet neben den strukturellen Informationen über das Protein und die molekularen Details der Substratbindung eine hervorragende Möglichkeit an strukturelle Informationen über die gebundenen Siderophore zu gelangen. Es existieren äußerst wenige Kleinmolekülkristallstrukturen von Eisen(III)–Siderophor-Komplexen, da die Kristallisation oftmals nicht erfolgreich ist. Daher war die Lösung der Kristallstruktur von $[V^{IV}(\text{Ent})]^{2-}$ ein Meilenstein in der Charakterisierung dieses wichtigen Siderophors.^[274-275] Bisher wurden die Eisenkomplexe der Siderophore Bacillibactin, Enterobactin und mecA in Komplex mit FeuA (diese Arbeit), mecA₂ in Komplex mit CeuE,^[99] Gallichrom, Desferal, Coprogen und Albomycin δ_2 in Komplex mit FhuD,^[84,126] Staphyloferrin A in Komplex mit HtsA^[156] und Staphyloferrin B in Komplex mit SirA^[159] gelöst. Darüberhinaus existieren Cokristallstrukturen mit Häm und Vitamin B₁₂, ein Überblick ist im Anhang (Tab. A-4) angegeben. Alternative Möglichkeiten zur Strukturaufklärung von Eisen(III)–Siderophor-Komplexen bietet mehrdimensionale NMR-Spektroskopie, die allerdings große Probenmengen und Substitution von Eisen(III) durch Gallium(III) verlangt.

Die Vermessung von Cokristallen am Synchrotron bietet hingegen den weiteren Vorteil die Siderophore durch *in crystallo*-Absorptionsspektroskopie zu verfolgen. Eine Interpretation der in Abb. 4-42 gezeigten Spektren ist jedoch mit den vorhandenen Daten nicht ohne weiteres möglich. Der Ursprung der Absorptionsverstärkung nach Exposition mit Synchrotronröntgenstrahlung könnte im Übergang zu einem höheren Energieniveau liegen. Darauf deutet auch die verstärkte Absorption bei 340 nm hin, die dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang des Siderophors entspricht.^[273]

5.2.3.1 Stereokonfiguration und potentielle weitere Substrate

Die Siderophorkomplexanionen $[\text{Fe}^{III}(\text{BB})]^{3-}$, $[\text{Fe}^{III}(\text{Ent})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{III}(\text{mecA})]^{3-}$ werden von FeuA in fast identischer Art und Weise gebunden, das Protein ist hingegen nicht fähig das Komplexanion des verwandten Triscatecholatsiderophors Vibriobactin, $[\text{Fe}^{III}(\text{VB})]^{3-}$, zu binden. Die Komplexanionen weisen ausnahmslos eine Λ -Stereokonfiguration ihres Metallzentrums im FeuA-gebundenen Zustand

auf, was auch durch die recht starre Bindungstasche bedingt ist, die in dieser Form keine Δ -Konfiguration zulassen würde (Abb. 5-7).

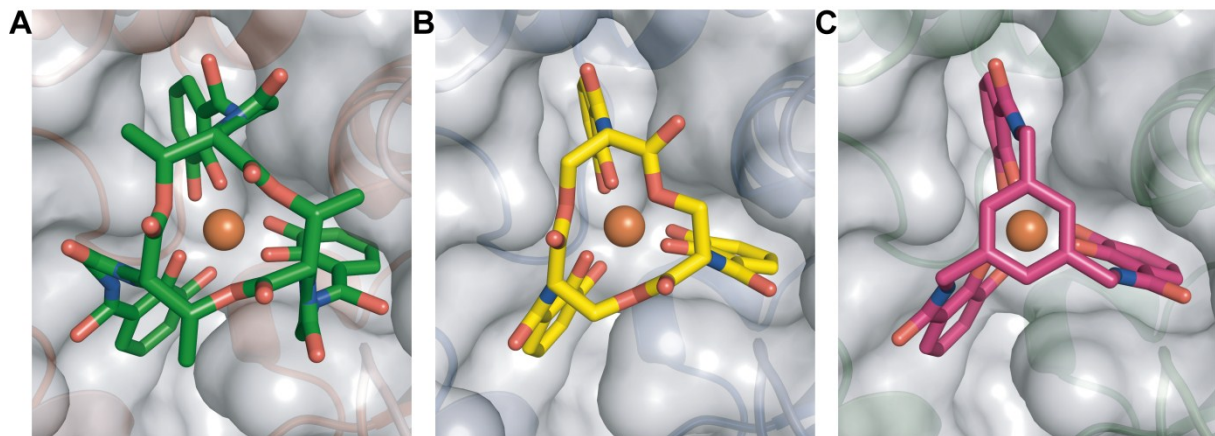


Abbildung 5-7: Blick entlang der (näherungsweise) C_3 -Achse in die FeuA-Bindungstasche.

A) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$. C) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$.

Dies ist vermutlich durch die Notwendigkeit einer distinkten Domänenbewegung nach Substratbindung gegeben, da nur dadurch die Interaktion mit der TMD des ABC-Transporterkomplexes stattfinden kann. Die Notwendigkeit der definierten Domänenbewegung resultiert in einer starren Bindungstasche, die einerseits die begrenzte Substratpromiskuität von FeuA erklärt (keine Bindung des sterisch anspruchsvolleren $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$) und andererseits in der Folge auch zum strikten Ausschluss Δ -konfigurierter Siderophore führt.

Die Δ -Konfiguration von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ wurde lange als Hauptunterscheidungsmerkmal für Transporter zum Δ -konfigurierten $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ angesehen. Die hier vorgestellten FeuA-Kristallstrukturen zeigen jedoch eindeutig, dass die Stereokonfiguration nicht zur Diskriminierung zwischen beiden Siderophoren dienen kann, da im gebundenen Zustand auch $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ die Δ -Konfiguration annimmt. Dies erklärt auch, dass die Bindung des Δ -konfigurierten $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{entio-Ent})]^{3-}$ in *E. coli* beobachtet werden konnte, auch wenn es nicht zum Wachstum des Bakteriums beitrug.^[299-300] Das Unvermögen, trotz Aufnahme zum Wachstum beizutragen erklärt sich in der Spezifität der Trilacton-Esterase Fes, die nicht fähig ist, das Trilactonrückgrat des aus D-Serin-Einheiten aufgebauten *entio-Ent* zu hydrolysieren.^[273]

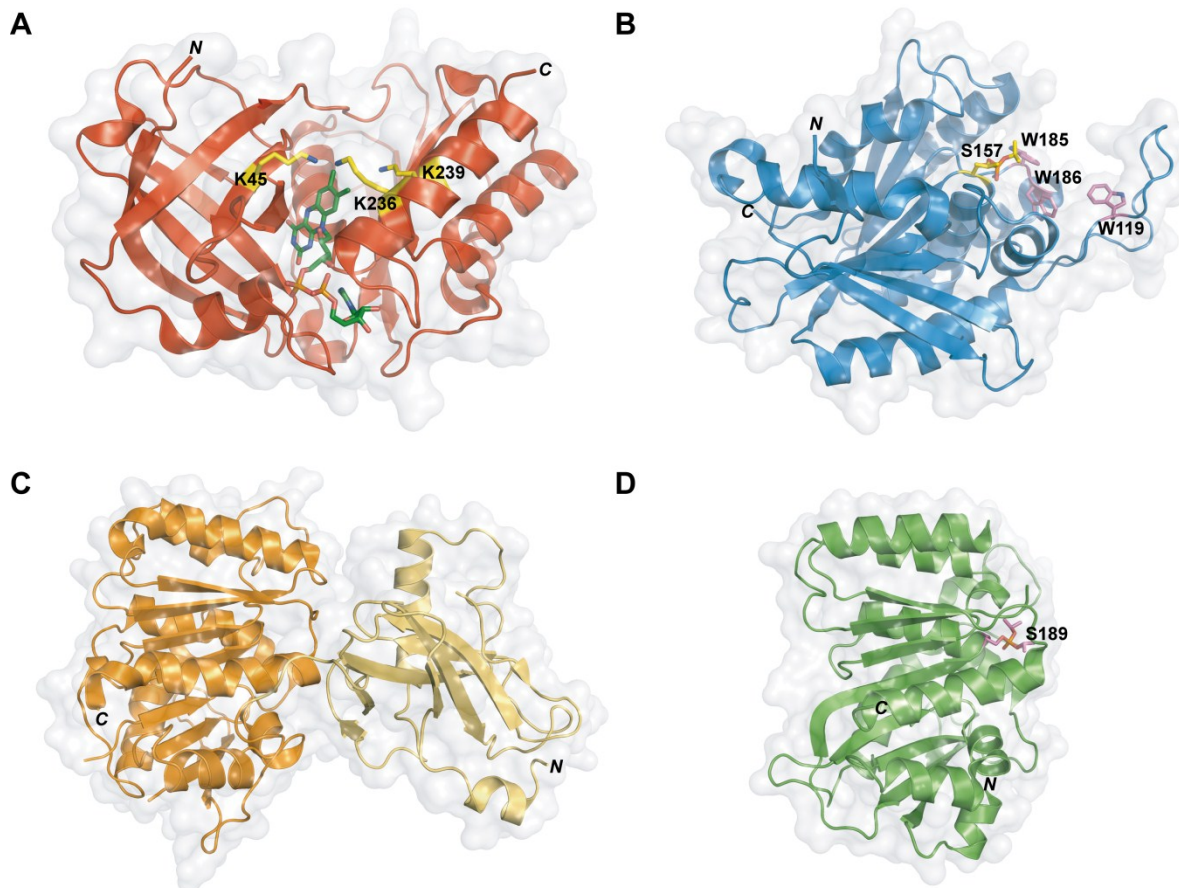


Abbildung 5-8: Kristallstrukturen Eisen(III)–Siderophor-prozessierender Enzyme.

A) Eisen(III)–Siderophor-Reduktase ViuB aus *Shewanella putrefaciens* (PDB-Code: 2GPJ). Der Cofaktor FAD (C: grün, N: blau, O: rot, P: orange) und die basische Triade (C: gelb, N: blau) sind als Stabmodell dargestellt. B) Trilactonsiderophor-Esterase Bes aus *B. cereus* (PDB-Code: 2QM0). Der voraussichtlich katalytisch aktive Ser-Rest wurde zu *O*-[Bis(1-Methylethoxy)-phosphoryl]-L-serin (C: gelb, O: rot, P: orange) modifiziert. Dieses, sowie drei putativ mit dem Substrat interagierende Trp-Reste (C: violett, N: blau), sind als Stabmodell dargestellt. C) Enterobactin-Esterase Fes aus *Shigella flexneri* (PDB-Code: 3C8D). Der verglichen mit IroE (gleiche Orientierung in D)) zusätzliche „Deckel“ ist in gelb dargestellt. D) Salmochelin-Hydrolase IroE aus *E. coli* (PDB-Code: 2GZS).^[301] Der mit dem Inhibitor Diisopropylfluorophosphonat verbundene katalytisch aktive Ser-Rest ist als Stabmodell dargestellt (C: magenta, O: rot, P: orange).

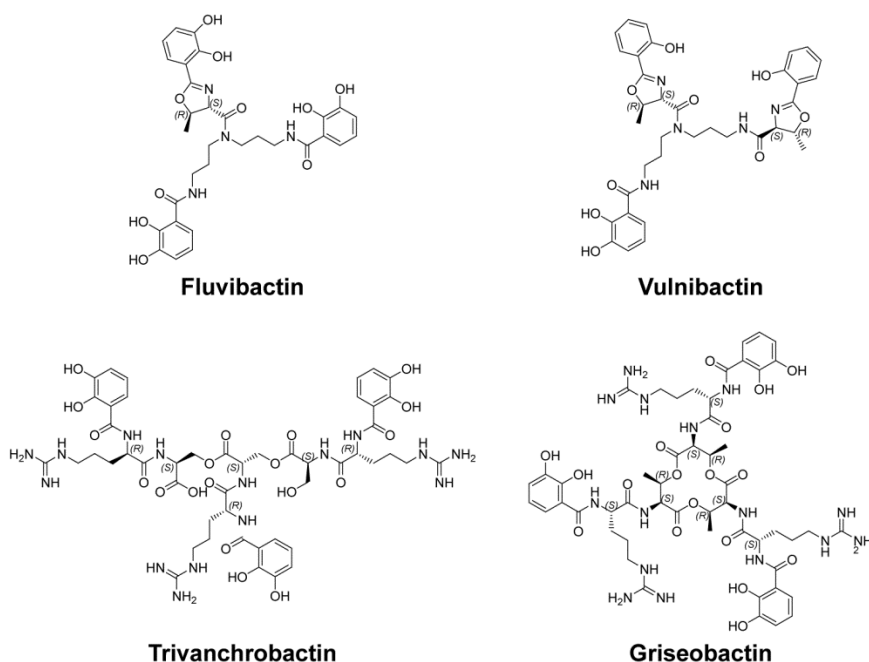
Die Kippbewegung der Catecholatringer ist für $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ etwa doppelt so groß wie für die beiden anderen Komplexanionen, dies liegt vermutlich am erhöhten sterischen Anspruch durch die zusätzlichen Glycinbausteine des Siderophors. Die Kippbewegung der drei Ringe ist in einem Siderophor zwar jeweils sehr ähnlich aber doch unterschiedlich stark, was höchstwahrscheinlich an ihrer unterschiedlichen chemischen Umgebung liegt. Dieses Zusammenspiel verdeutlicht den großen Einfluss, welchen die Bindungstasche auf die Gesamtkonformation der Siderophore ausübt. Dies wird insbesondere durch den Wechsel der Stereokonfiguration von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ von Δ in freier Lösung hin zu Λ gebunden durch FeuA deutlich. Weiterhin erklärt die ausschließliche Akzeptanz Λ -konfigurierter Triscatecholate die leicht höheren Affinitäten der SBP FeuA und FepB zu dem aus D-Aminosäuren aufgebauten Enantiomeren $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{enantio-Ent})]^{3-}$.^[273,296] Auch das Enterobactin-Bindungsprotein CeuE aus *C. jejuni* vermag das Siderophormimetikum mecamin nur in Λ -Konfiguration zu binden,^[99] gleiches gilt für das menschliche Immunoprotein Siderocalin.^[58] Neben ihrer Bedeutung für den Transport

scheint die Λ -Konfiguration von ebenso großer Bedeutung für die Erkennung durch weitere Enzyme, die an der intrazellulären Prozessierung des Siderophors beteiligt sind, zu sein. Auch die putative Eisen(III)–Siderophorreduktase YqjH aus *E. coli* weist eine basische Triade auf und bindet ausschließlich Λ -konfigurierte Substrate.^[302] Eine Kristallstruktur des Homologen ViuB aus *Shewanella putrefaciens* mit der basischen Triade K45, K236 und K239 ist in Abb. 5-8A gezeigt.

Im zweiten Freisetzungsweg für Triscatecholatsiderophor-gebundenes Eisen(III) spielt die Stereokonfiguration des Metallzentrums hingegen keine Rolle: Die Bacillibactinesterase BesA aus *B. subtilis* bindet Enterobactin in Δ -Stereokonfiguration. Da in den eigenen Messungen jedoch die katalytisch inaktive Variante BesA-S188A vermessen wurde und nicht bekannt ist, ob diese die Siderophore zu binden vermag, kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass hier das Siderophor in freier Lösung vermessen wurde. Weitere Untersuchungen von BesA zeigten, dass hingegen die Chiralität des Trilactonrückgrats von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Hydrolyse ist. So werden synthetische, aus D-Aminosäuren aufgebaute Derivate der Siderophore weder von BesA noch von seinem *E. coli*-Homologen Fes hydrolysiert.^[273] Kristallstrukturen dieser Siderophoresterasen sind in Abb. 5-8 gezeigt.

Die weiteren in dieser Arbeit auf Bindung durch FeuA getesteten Substrate waren $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{VB})]^{3-}$ und $[\text{Fe}^{\text{III}}(2,3\text{-DHB})_3]^{6-}$. Während der Eisen(III)-Komplex des Siderophorvorläufers 2,3-DHB durch FeuA noch moderat gebunden wurde und eine schwach ausgeprägte Λ -Konfiguration annahm, konnte im Falle des entfernt verwandten Vibriobactins keine distinkt in Anwesenheit des Proteins angenommene Stereokonfiguration und auch keine Bindung beobachtet werden. Dies liegt vermutlich am deutlich größeren sterischen Anspruch der Oxazolinringe, die direkt an zwei der drei Catecholateinheiten angebracht sind.^[33,303] Daher ist es auch höchst unwahrscheinlich, dass die Siderophore Fluvibactin aus *Vibrio fluvialis* und Vulnibactin aus *Vibrio vulnificus* von FeuA erkannt und gebunden werden könnten. Diese weisen hohe Verwandtschaft mit VB auf: Bei Vulnibactin sind die zwei mit den Oxazolinringen verbundenen Catecholatgruppen durch Phenolatgruppen ersetzt und bei Fluvibactin ist im Gegensatz zu Vibriobactin nur eine Catecholateinheit mit einem Oxazolinring verbunden.

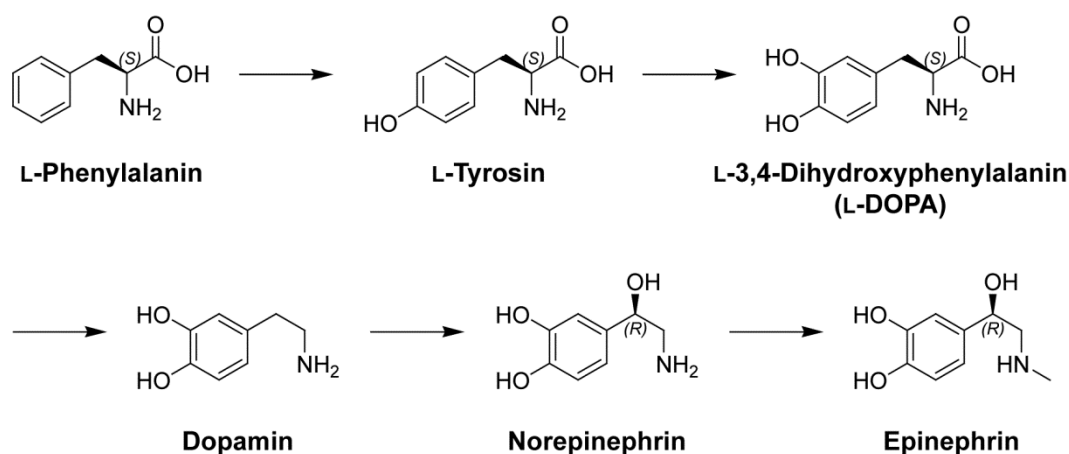
Weiterhin wurden kürzlich zwei weitere Vertreter der Triscatecholatsiderophore beschrieben: Griseobactin (GB) aus *Streptomyces griseus*^[304] und Trivanchrobactin (TVB) aus *Vibrio* sp. DS40M4 (Schema 5-3).^[305] Die Trilactonform von TVB wurde beschrieben, dies mag allerdings an der Isolations- und Reinigungsmethodik liegen. Gemein ist beiden Siderophoren eine Substitution des in BB vorhandenen Glycins durch die ungleich größere Aminosäure Arginin.



Schema 5-3: Weitere Triscatecholatsiderophore.

Eine Strukturformel wurde in der Originalpublikation für GB nicht gezeigt, allerdings wurde es als strukturell verwandt zu BB und Ent beschrieben.^[304] Die hier gezeigte Strukturformel basiert daher auf dieser Beschreibung.

Neben der deutlich veränderten elektrochemischen Eigenschaften des basischen Arginins erscheint es schon allein aufgrund der geringen Substrattoleranz von FeuA in Bezug auf den sterischen Anspruch der Reste nahe des Eisen(III)–Oxo-Zentrums eher unwahrscheinlich, dass es fähig sein würde diese beiden Siderophore zu binden. Gleiches gilt für Salmocheline, die durch ihre glycosylierten Catecholateinheiten ebenfalls einen erheblich höheren sterischen Anspruch generieren und daher voraussichtlich durch FeuA wenn überhaupt nur mit äußerst geringer Affinität gebunden würden.



Schema 5-4: Biosynthese von Epinephrin ausgehend von Phenylalanin.

Desweiteren ist die Bindung des Eisen(III)-Komplexes von L-Norepinephrin (NE) durch FeuA mit einer Affinitätskonstante von etwa $1.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ und die Abhängigkeit des Transports dieses

Eisenkomplexes vom FeuABC–YusV₂-Transporter bekannt.^[272] Bei NE (auch Noradrenalin) handelt es sich um einen Neurotransmitter, der im menschlichen Körper ausgehend von den Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin hergestellt wird (Schema 5-4).

NE weist ein 3,4-Hydroxylierungsmuster seines aromatischen Rings auf und ist daher von den 2,3-substituierten Siderophoren wie BB und Ent deutlich verschieden. Nichtsdestoweniger ist es fähig Eisen(III)-Komplexe zu bilden und kann von Pathogenen zur Eisenversorgung herangezogen werden (siehe beispielsweise ^[306-308]). Das 3,4-Substitutionsmuster von NE spiegelt sich mutmaßlich in der niedrigeren Affinität von FeuA gegenüber seines Eisen(III)-Komplexes wider. Die Frage wie dieser Komplex in der Bindungstasche von FeuA Platz findet und gebunden wird, müsste durch Kristallstrukturanalyse beantwortet werden.

5.2.3.2 [Fe^{III}(BB)]³⁻

Dem Aufbau und der Konfiguration von Bacillibactin als endogenem Siderophor von *B. subtilis* kommt besondere Bedeutung zu. Aufgrund der 2001 beschriebenen Biosynthese von Bacillibactin blieb die Konfiguration des zweiten Stereozentrums der Threonineinheiten fraglich. So aktiviert die NRPS Dhbf *in vitro* sowohl das (2*S*,3*R*)-konfigurierte L-Thr als auch das (2*S*,3*S*)-konfigurierte L-*allo*-Thr (Aktivierungsverhältnis etwa 2:1).^[22] Die vorliegende Cokristallstruktur von FeuA·[Fe^{III}(BB)]³⁻ lässt eindeutig erkennen, dass bei der BB-Assemblierung ausschließlich das natürliche Substrat L-Thr verwendet wird. Interessante und unerwartete Eigenschaften zeigte auch der Trilactonring des Siderophors. Betrachtet man die zwölfgliedrigen Ringe in BB und Ent als drei fusionierte Cyclohexanringe mit fehlendem Zentralatom, dann sind zwei unterschiedliche Konformationen möglich, die dem Umstand Rechnung tragen, dass jeder der Ringe eine Sesselkonformation annehmen muss: Eine in der die Amidfunktionalitäten alle in axialer und eine in der sie alle in äquatorialer Position angeordnet sind.^[273] In der Folge sind alle Carbonylfunktionen des Trilactons vom Metallzentrum weg bzw. zu ihm hin ausgerichtet.

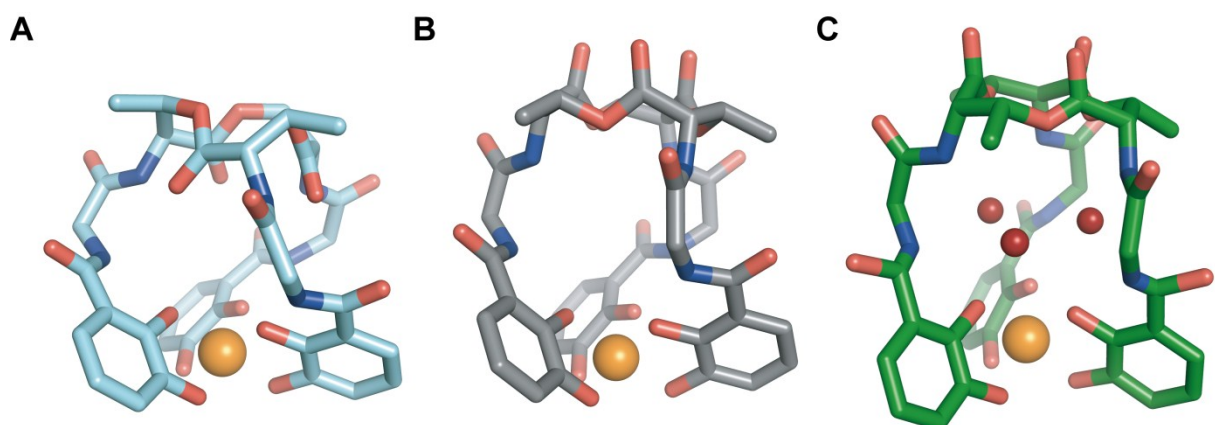


Abbildung 5-9: Berechnete und beobachtete Strukturen von [Fe^{III}(BB)]³⁻.

A) Energieminimierte Struktur von [Fe^{III}(BB)]³⁻. Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: invertiert.^[277] B) Energieminimierte Struktur von [Fe^{III}(BB)]³⁻. Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: normal.^[277] C) Beobachtete Struktur von durch FeuA gebundenem [Fe^{III}(BB)]³⁻. Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: normal.

Berechnungen zeigten, dass die Carbonylfunktionen in der energieärmsten Struktur von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ in einem sog. invertierten Makrozyklus zum Metallzentrum hin ausgerichtet sind, was mit zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen erklärt wurde, die diese Konformation ausbilden kann. Eine weitere, als um $2.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ weniger stabil berechnete Struktur wurde ebenfalls vorgestellt. Diese Struktur zeigt gute Übereinstimmung mit der hier beobachteten, von FeuA gebundenen Struktur (Abb. 5-9).^[277]

Die *in vacuo*-Kalkulationen berücksichtigten allerdings nicht die natürliche, wässrige Umgebung des Siderophors. Die Cokristallstruktur lässt drei hochgeordnete Wassermoleküle erkennen, die durch ein umfangreiches Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen die als weniger stabil berechnete Struktur von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ mit „normalem“ Makrozyklus stabilisieren. Diese Stabilisierung mag auch der Grund für die deutlich geringere Hydrolyseempfindlichkeit von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ verglichen mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ sein. Aufgrund der fehlenden Glycinbausteine und des damit verbundenen deutlich geringeren Abstandes zwischen Trilactonring und Metallzentrum wären Wassermoleküle nicht in der Lage, zwischen diese beiden Komponenten von Ent zu interkalieren. Selbst bei Inkubation über Nacht in 6 mol L^{-1} Salzsäure bleibt $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ im Gegensatz zu $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ fast vollständig intakt.^[273] Neben der Stabilisierung durch die Wassermoleküle kann ein Grund auch an der zusätzlichen sterischen Hinderung durch die Methylgruppen der Threonineinheiten, verglichen mit dem Serintrilacton, liegen. Diese Frage ließe sich mit einem synthetischen Ser→Thr-Derivat von Enterobactin beantworten, allerdings waren entsprechende Syntheseveruche bisher erfolglos.^[273]

5.2.3.3 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$

Das auffälligste Merkmal von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ verglichen mit $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ liegt in der unterschiedlichen Stereokonfiguration in Lösung. Berechnungen zeigten, dass der Energieunterschied zwischen Δ - und Λ -Konfiguration mit $2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ sehr gering ist, ebenso ist eine Λ -konfigurierte Konformation mit invertiertem Makrozyklus nur um $2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ weniger stabil.^[277] Dies drückt sich neben der $\Delta \rightarrow \Lambda$ -Invertierung auch in der strukturellen Flexibilität des Siderophors in den bisher zur Verfügung stehenden Strukturen aus. Die erste bekannte Struktur war die Kleinmolekülkristallstruktur von $[\text{V}^{\text{IV}}(\text{Ent})]^{2-}$, die ein Δ -konfiguriertes Siderophorkomplexanion mit „normalem“ Makrozyklus zeigte.^[274-275] Betrachtet man eine Kristallstruktur von menschlichem Siderocalin mit intakten $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanionen, kann man zwei verschiedene Konformationen beobachten: Eine mit invertiertem Makrozyklus und eine in der die Carbonylfunktionen eher seitlich nach oben stehen, eine Art Zustand zwischen beiden Extremen (Abb. 5-10A und B). Das FeuA-gebundene $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ weist wiederum eine andere Konformation auf: Zwei der Carbonylfunktionen zeigen vom Metall weg, die dritte zeigt seitlich nach oben, mithin ist eine lokal gebrochene Symmetrie des Komplexanions zu beobachten (Abb. 5-10C).

Die NMR-Struktur des an Lipocalin Q83 aus *Coturnix japonica* gebundenen $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ ist zwar recht hochgeordnet (Abb. 5-10D), weist jedoch im Gegensatz zu allen anderen Konformationen eine Δ -Konfiguration am Metallzentrum auf. Dies mag allerdings an der Art der Strukturdaten liegen: Bei der Berechnung der Bibliotheksdatenbank für $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ wurde die (Δ -konfigurierte)

$[V^{IV}(\text{Ent})]^{2-}$ -Struktur als Modell verwendet. Es mag sein, dass die Konfiguration im nachfolgenden Berechnungsprozess nicht weiter beachtet wurde. Die Form der Oberfläche der Bindungstasche deutet jedenfalls eher auf ein Λ -konfiguriertes Siderophor hin.

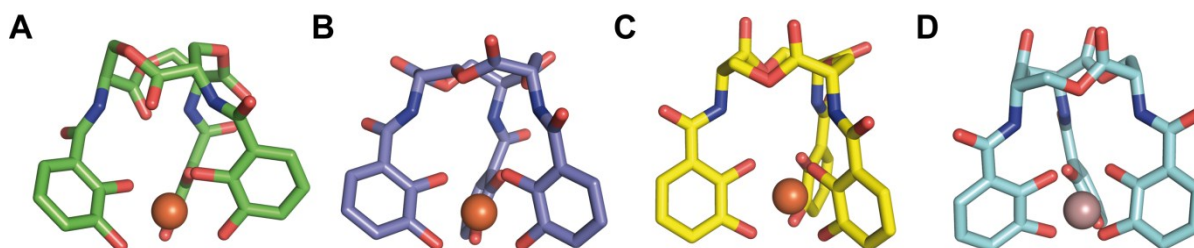
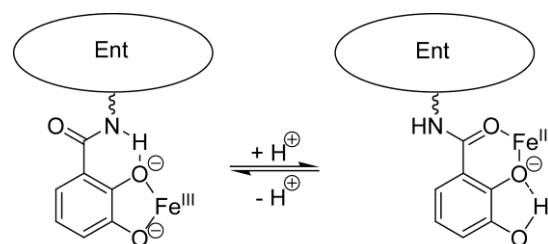


Abbildung 5-10: Konformationelle Flexibilität von $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$.

A) Siderocalin-gebundenes $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ (PDB-Code: 3CMP, Kette A). Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: invertiert. B) $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ (PDB-Code: 3CMP, Kette C). Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: Zwischenform. C) FeuA-gebundenes $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$. Stereokonfiguration: Λ , Makrozyklus: etwas deformiert, ansonsten normal. D) Lipocalin Q83-gebundenes $[\text{Ga}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ (PDB-Code: 2KT4).^[67] Stereokonfiguration: Δ , Makrozyklus: normal.

Eine Besonderheit der Eisen(III)-Bindung von Ent ist seine Fähigkeit nach Protonierung der drei *meta-O*-Atome von einem Catechol- in einen Salicylatbindungsmodus überzugehen und damit vom $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanion zum neutralen $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{-Ent})]$ -Komplex zu wechseln (Schema 5-5, nach [309]).^[309-310]

Zwar kann Ent offensichtlich auch nach partieller Protonierung die Bindung des Eisen(III)-Kations zunächst beibehalten, andererseits stellt die Protonierung einen alternativen Weg für die Freisetzung des Eisens dar, da sich das Redoxpotential des Komplexes nach Protonierung deutlich erhöht und es somit dem Einfluss bakterieller Reduktasen zugänglich wird. Ob auch



Schema 5-5: Koordinationswechsel vom Catechol- zum Salicylatbindungsmodus.

für BB ein Catechol-→Salicylat-Koordinationswechsel möglich wäre ist aufgrund der drei zwischen Eisen(III)-Oxo-Zentrum und Trilacton interkalierten Wassermoleküle fraglich, da diese die notwendige konformationelle Änderung des Siderophors stören könnten. Damit mag auch die Beobachtung zusammenhängen, dass das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BB})]^{3-}$ -Komplexanion deutlich säurestabiler ist als das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{Ent})]^{3-}$ -Komplexanion,^[273] was möglicherweise in den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ihrer jeweiligen Produzenten bzw. in deren natürlichem Habitat begründet liegt.

5.2.3.4 $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$

Das synthetische Siderophoranalogon mecam wird seit langem als Mimetikum eingesetzt, um die Bindung und Aufnahme von Siderophoren zu verstehen. Im Gegensatz zu seinen natürlichen Verwandten BB und Ent besitzt es ein nicht hydrolysierbares Rückgrat, was es zu einer robusten Sonde macht.

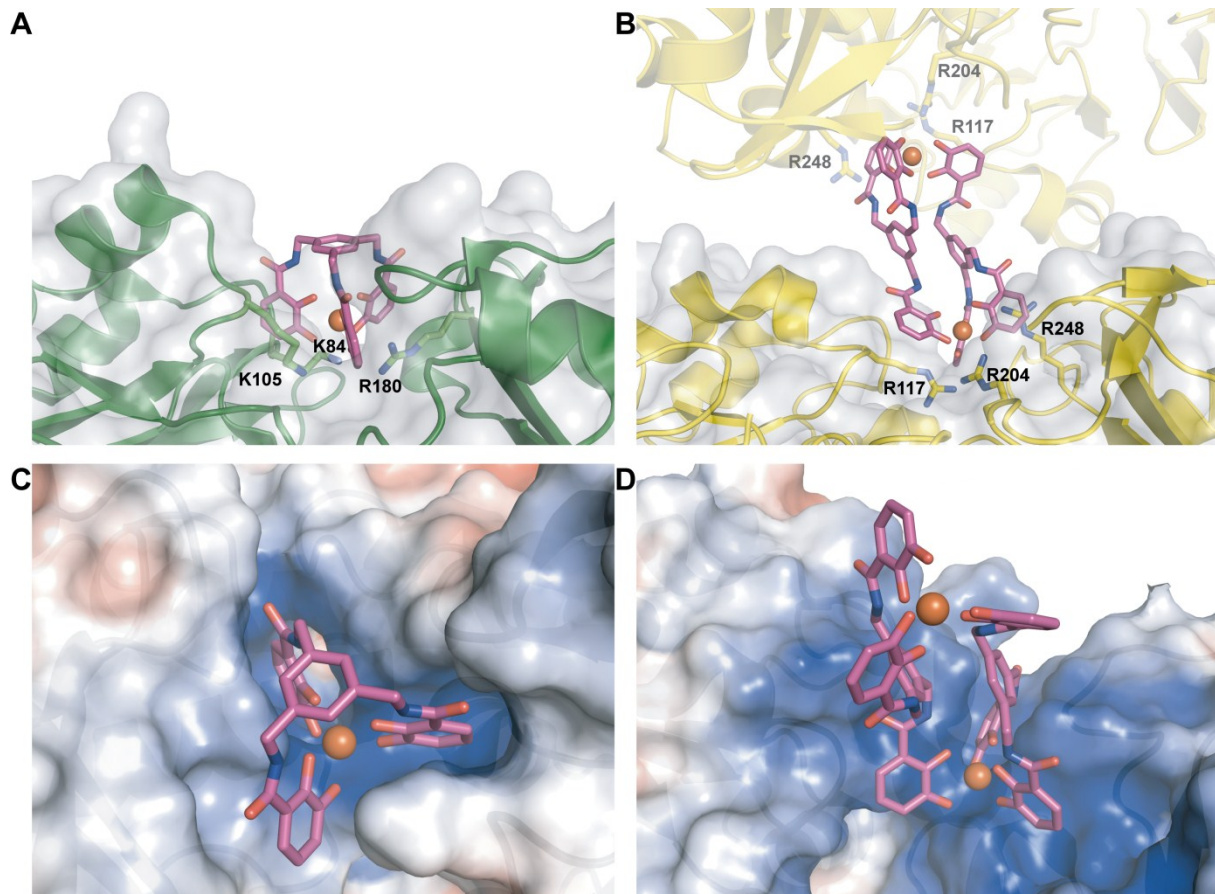


Abbildung 5-11: Vergleich der Bindungstaschen von FeuA und CeuE.

A) und B) Bindungstaschen von $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ und $\text{CeuE} \cdot \{[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]_2\}^{6-}$ (PDB-Code: 2CHU).^[99]
 C) und D) Darstellung der elektrostatischen Oberfläche der Bindungstaschen (von -5 (rot) bis +5 (blau) $k_B T/e_C$).

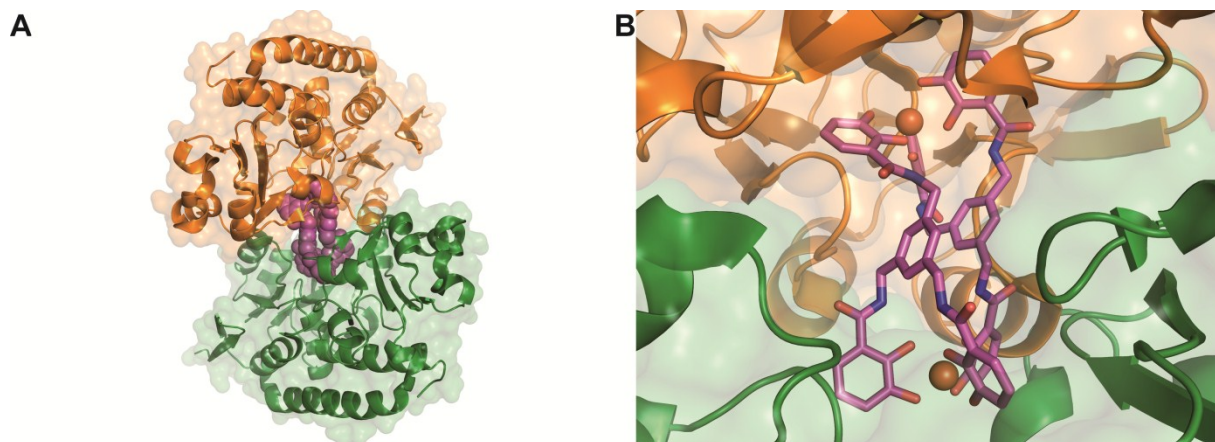


Abbildung 5-12: Modell eines $\text{FeuA}_2 \cdot \{[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]_2\}^{6-}$ -Dimers.

A) Gesamtansicht. B) Bindungstasche. Das $\{[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]_2\}^{6-}$ -Komplexanion aus der CeuE-Struktur (PDB-Code: 2CHU) wurde durch Überlagerung mit den $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexanionen manuell in die Bindungstaschen zweier FeuA-Moleküle (grün bzw. orange) eingepasst.

Die physiologische Signifikanz seines Eisen(III)-Komplexanions ist nicht vollständig geklärt. Erste Untersuchungen zeigten eine mit Ent vergleichbare Wachstumsförderung,^[101-102] während spätere Experimente eine Akkumulation des Komplexanions im Periplasma von *E. coli* nahelegten.^[103-104]

Besondere Aufmerksamkeit erhielt *mecam* daher durch die 2006 veröffentlichte Verbrückung von zwei SBP durch ein zweikerniges Λ, Λ - $[\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})\}_2]^{6-}$ -Komplexanion (siehe Abb. 1-5), welche die Akkumulation zu erklären schien.^[99] Allerdings hatten vorherige Berechnungen eine einkernige Struktur des Komplexanions vorausgesagt.^[100] Die hier vorgestellte Kristallstruktur des $\text{FeuA} \cdot [\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Komplexes zeigt völlig andere Eigenschaften als die $\text{Ceue}_2 \cdot [\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})\}_2]^{6-}$ -Struktur. Der *FeuA*-gebundene Eisen(III)-*mecam*-Komplex weist eine einkernige Struktur auf, so wie es ursprünglich erwartet und angedacht war. Etwaige π - π -Wechselwirkungen zweier möglicherweise Kopf-an-Kopf-liegender Komplexanionen konnten ebenfalls nicht festgestellt werden, so dass es sich insgesamt um eine eindeutig monomere Struktur handelt.

Woher diese signifikanten Unterschiede kommen ist unklar. Da *mecam* im Gegensatz zu den nativen Siderophoren BB und Ent nicht über ein chirales Rückgrat verfügt, ist die Beweglichkeit der drei Catecholamid-„Arme“ deutlich weniger stark eingeschränkt, was die Bildung des beobachteten Dimers begünstigen könnte. Möglicherweise handelt es sich bei der dimeren *CeuE*-Struktur schlicht um ein Kristallisationsartefakt, allerdings könnten auch die deutlich verschiedenen Bindungstaschen der zwei Proteine den Ausschlag geben. Das $[\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})\}_2]^{6-}$ -Dimer ist durch *CeuE* in einer deutlich flacheren Tasche gebunden, als das $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})]^{3-}$ -Monomer durch *FeuA*. Während die Reste R204 und R248 von unten auf das Siderophorkomplexanion ausgerichtet sind, ist die basische Triade in *FeuA* eher von der gleichen Ebene oder von darüber auf das Eisen(III)-Oxozentrum ausgerichtet, was in einer deutlich tieferen Tasche resultiert (Abb. 5-11).

Die Tiefe der Bindungstasche von *FeuA* und die damit verbundenen höheren sterischen Ansprüche könnten zu einer Kollision zweier über ein $[\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})\}_2]^{6-}$ -Komplexanion verbundenen Proteine führen. Dies wird vom *CeuE*-Dimer neben den flachen Bindungstaschen auch dadurch verhindert, dass sich die zwei Makromoleküle etwa senkrecht versetzt zueinander ausrichten. Bei (manueller) Einpassung des $[\{\text{Fe}^{\text{III}}(\text{mecam})\}_2]^{6-}$ -Komplexanions in die *FeuA*-Bindungstasche zeigt sich, dass eine solche senkrechte Ausrichtung bei einem *FeuA*-Dimer nicht ausreichend wäre, um eine massive Kollision der beiden Proteine zu verhindern (Abb. 5-12).

Die Evolution der Bindungstaschen bakterieller Siderophorbindungsproteine könnte daher in verschiedenen bakteriellen Phyla unabhängig voneinander gewesen sein, basierend auf einem Vorfahren der „Helix-Rückgrat-Familie“, der genug Formbarkeit aufwies, um strukturell verschiedene Bindungsmodi für funktionell ähnliche Erkennungsmodi zu etablieren.

6 Literatur

- [1] F. Archibald. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **1983**, *19*, 29–32.
- [2] S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodríguez-Quñones. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 215–237.
- [3] K. N. Raymond, C. J. Carrano. Coordination chemistry and microbial iron transport. *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 183–190.
- [4] J. R. Chipperfield, C. Ratledge. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *BioMetals* **2000**, *13*, 165–168.
- [5] C. J. Carrano, K. N. Raymond. Ferric ion sequestering agents. 2. Kinetics and mechanism of iron removal from transferrin by enterobactin and synthetic tricatechols. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5401–5404.
- [6] R. C. Hider, X. Kong. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 637–657.
- [7] L. R. Devireddy, D. O. Hart, D. H. Goetz, M. R. Green. A mammalian siderophore synthesized by an enzyme with a bacterial homolog involved in enterobactin production. *Cell* **2010**, *141*, 1006–1017.
- [8] M. Miethke, M. A. Marahiel. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 413–451.
- [9] H. Boukhalfa, A. L. Crumbliss. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* **2002**, *15*, 325–339.
- [10] Z. D. Liu, R. C. Hider. Design of clinically useful iron(III)-selective chelators. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 26–64.
- [11] C. Klumpp, A. Burger, G. L. Mislin, M. A. Abdallah. From a total synthesis of cepabactin and its 3:1 ferric complex to the isolation of a 1:1:1 mixed complex between iron (III), cepabactin and pyochelin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1721–1724.
- [12] C. F. Tseng, A. Burger, G. L. Mislin, I. J. Schalk, S. S. Yu, S. I. Chan, M. A. Abdallah. Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 419–432.
- [13] C. J. Carrano, K. N. Raymond. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds: rhodotorulic acid and iron uptake in *Rhodotorula pilimanae*. *J. Bacteriol.* **1978**, *136*, 69–74.
- [14] H. Drechsel, A. Thieken, R. Reissbrodt, G. Jung, G. Winkelmann. α -Keto acids are novel siderophores in the genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* and are produced by amino acid deaminases. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2727–2733.
- [15] H. Drechsel, G. Jung. Peptide siderophores. *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 147–181.
- [16] L. D. Loomis, K. N. Raymond. Solution Equilibria of Enterobactin and Metal Enterobactin Complexes. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 906–911.
- [17] E. A. Dertz, J. Xu, A. Stintzi, K. N. Raymond. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 22–23.
- [18] J. H. Crosa, C. T. Walsh. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 223–249.
- [19] R. Finking, M. A. Marahiel. Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [20] M. Strieker, A. Tanovic, M. A. Marahiel. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–240.
- [21] H. Budzikiewicz, A. Bössenkamp, K. Taraz, A. Pandey, J.-M. Meyer. Corynebactin, a Cyclic Catecholate Siderophore from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 (*Brevibacterium* sp. DSM 20411). *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **1997**, *52*, 551–554.

- [22] J. J. May, T. M. Wendrich, M. A. Marahiel. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 7209–7217.
- [23] E. A. Dertz, A. Stintzi, K. N. Raymond. Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 1087–1097.
- [24] M. A. Marahiel. *Persönliche Mitteilung* **2008**.
- [25] N. Bsat, A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow, J. D. Helmann. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* **1998**, 29, 189–198.
- [26] N. Bsat, J. D. Helmann. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (ferric uptake repressor) with the *dhb* operator in vitro and in vivo. *J. Bacteriol.* **1999**, 181, 4299–4307.
- [27] B. M. Rowland, H. W. Taber. Duplicate isochorismate synthase genes of *Bacillus subtilis*: regulation and involvement in the biosyntheses of menaquinone and 2,3-dihydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 854–861.
- [28] B. M. Rowland, T. H. Grossman, M. S. Osburne, H. W. Taber. Sequence and genetic organization of a *Bacillus subtilis* operon encoding 2,3-dihydroxybenzoate biosynthetic enzymes. *Gene* **1996**, 178, 119–123.
- [29] J. J. May, N. Kessler, M. A. Marahiel, M. T. Stubbs. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 12120–12125.
- [30] S. Khalil, P. D. Pawelek. Enzymatic Adenylation of 2,3-Dihydroxybenzoate Is Enhanced by a Protein-Protein Interaction between *Escherichia coli* 2,3-Dihydro-2,3-dihydroxybenzoate Dehydrogenase (EntA) and 2,3-Dihydroxybenzoate-AMP Ligase (EntE). *Biochemistry* **2011**, 50, 533–545.
- [31] A. M. Gehring, K. A. Bradley, C. T. Walsh. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* **1997**, 36, 8495–8503.
- [32] T. A. Keating, C. G. Marshall, C. T. Walsh. Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* **2000**, 39, 15513–15521.
- [33] T. A. Keating, C. G. Marshall, C. T. Walsh. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* **2000**, 39, 15522–15530.
- [34] G. L. Challis. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **2005**, 6, 601–611.
- [35] D. Oves-Costales, N. Kadi, G. L. Challis. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem. Commun.* **2009**, 6530–6541.
- [36] K. Barbeau, G. Zhang, D. H. Live, A. Butler. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 378–379.
- [37] B. L. Garner, J. E. Arceneaux, B. R. Byers. Temperature control of a 3,4-dihydroxybenzoate (protocatechuate)-based siderophore in *Bacillus anthracis*. *Curr. Microbiol.* **2004**, 49, 89–94.
- [38] A. T. Koppisch, C. C. Browder, A. L. Moe, J. T. Shelley, B. A. Kinkel, L. E. Hersman, S. Iyer, C. E. Ruggiero. Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *BioMetals* **2005**, 18, 577–585.
- [39] M. K. Wilson, R. J. Abergel, K. N. Raymond, J. E. Arceneaux, B. R. Byers. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 348, 320–325.
- [40] K. Hotta, C. Y. Kim, D. T. Fox, A. T. Koppisch. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology* **2010**, 156, 1918–1925.

-
- [41] S. Cendrowski, W. MacArthur, P. Hanna. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol. Microbiol.* **2004**, *51*, 407–417.
- [42] J. Y. Lee, B. K. Janes, K. D. Passalacqua, B. F. Pfeleger, N. H. Bergman, H. Liu, K. Hakansson, R. V. Somu, C. C. Aldrich, S. Cendrowski, P. C. Hanna, D. H. Sherman. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 1698–1710.
- [43] B. F. Pfeleger, J. Y. Lee, R. V. Somu, C. C. Aldrich, P. C. Hanna, D. H. Sherman. Characterization and analysis of early enzymes for petrobactin biosynthesis in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4147–4157.
- [44] A. M. Friedlander. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* **2000**, *20*, 335–349.
- [45] T. V. Inglesby, T. O'Toole, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. M. Friedlander, J. Gerberding, J. Hauer, J. Hughes, J. McDade, M. T. Osterholm, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, K. Tonat. Anthrax as a biological weapon, 2002: updated recommendations for management. *J. Am. Med. Assoc.* **2002**, *287*, 2236–2252.
- [46] S. J. Hickford, F. C. Kupper, G. Zhang, C. J. Carrano, J. W. Blunt, A. Butler. Petrobactin sulfonate, a new siderophore produced by the marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1897–1899.
- [47] V. V. Homann, K. J. Edwards, E. A. Webb, A. Butler. Siderophores of *Marinobacter aquaeolei*: petrobactin and its sulfonated derivatives. *BioMetals* **2009**, *22*, 565–571.
- [48] R. J. Bergeron, G. Huang, R. E. Smith, N. Bharti, J. S. McManis, A. Butler. Total synthesis and structure revision of petrobactin. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2007–2014.
- [49] D. Oves-Costales, N. Kadi, M. J. Fogg, L. Song, K. S. Wilson, G. L. Challis. Enzymatic logic of anthrax stealth siderophore biosynthesis: AsbA catalyzes ATP-dependent condensation of citric acid and spermidine. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8416–8417.
- [50] D. Oves-Costales, L. Song, G. L. Challis. Enantioselective desymmetrisation of citric acid catalysed by the substrate-tolerant petrobactin biosynthetic enzyme AsbA. *Chem. Commun.* **2009**, 1389–1391.
- [51] A. T. Koppisch, K. Hotta, D. T. Fox, C. E. Ruggiero, C. Y. Kim, T. Sanchez, S. Iyer, C. C. Browder, P. J. Unkefer, C. J. Unkefer. Biosynthesis of the 3,4-dihydroxybenzoate moieties of petrobactin by *Bacillus anthracis*. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5759–5765.
- [52] B. F. Pfeleger, Y. Kim, T. D. Nusca, N. Maltseva, J. Y. Lee, C. M. Rath, J. B. Scaglione, B. K. Janes, E. C. Anderson, N. H. Bergman, P. C. Hanna, A. Joachimiak, D. H. Sherman. Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 17133–17138.
- [53] D. T. Fox, K. Hotta, C. Y. Kim, A. T. Koppisch. The missing link in petrobactin biosynthesis: *asbF* encodes a (–)-3-dehydroshikimate dehydratase. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12251–12253.
- [54] D. Oves-Costales, N. Kadi, M. J. Fogg, L. Song, K. S. Wilson, G. L. Challis. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with *N*⁸-citryl-spermidine and its *N*¹-(3,4-dihydroxybenzoyl) derivative. *Chem. Commun.* **2008**, 4034–4036.
- [55] P. E. Carlson, Jr., S. D. Dixon, B. K. Janes, K. A. Carr, T. D. Nusca, E. C. Anderson, S. E. Keene, D. H. Sherman, P. C. Hanna. Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **2010**, *75*, 900–909.
- [56] D. H. Goetz, S. T. Willie, R. S. Armen, T. Bratt, N. Borregaard, R. K. Strong. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* **2000**, *39*, 1935–1941.
- [57] R. K. Strong, in *Lipocalins* (Eds.: B. Akerström, N. Borregaard, D. R. Flower, J.-P. Salier), Landes Bioscience, Austin, Texas, **2006**.
- [58] D. H. Goetz, M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond, R. K. Strong. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1033–1043.

- [59] R. J. Abergel, M. K. Wilson, J. E. Arceneaux, T. M. Hoette, R. K. Strong, B. R. Byers, K. N. Raymond. Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 18499–18503.
- [60] M. A. Holmes, W. Paulsene, X. Jide, C. Ratledge, R. K. Strong. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* **2005**, *13*, 29–41.
- [61] T. H. Flo, K. D. Smith, S. Sato, D. J. Rodriguez, M. A. Holmes, R. K. Strong, S. Akira, A. Aderem. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **2004**, *432*, 917–921.
- [62] T. M. Hoette, R. J. Abergel, J. Xu, R. K. Strong, K. N. Raymond. The role of electrostatics in siderophore recognition by the immunoprotein Siderocalin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17584–17592.
- [63] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty. Cation- π interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 9459–9464.
- [64] J. Yang, D. Goetz, J. Y. Li, W. Wang, K. Mori, D. Setlik, T. Du, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R. Strong, J. Barasch. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 1045–1056.
- [65] R. J. Abergel, M. C. Clifton, J. C. Pizarro, J. A. Warner, D. K. Shuh, R. K. Strong, K. N. Raymond. The siderocalin/enterobactin interaction: a link between mammalian immunity and bacterial iron transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11524–11534.
- [66] G. Bao, M. Clifton, T. M. Hoette, K. Mori, S. X. Deng, A. Qiu, M. Viltard, D. Williams, N. Paragas, T. Leete, R. Kulkarni, X. Li, B. Lee, A. Kalandadze, A. J. Ratner, J. C. Pizarro, K. M. Schmidt-Ott, D. W. Landry, K. N. Raymond, R. K. Strong, J. Barasch. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 602–609.
- [67] N. Coudeville, L. Geist, M. Hotzinger, M. Hartl, G. Kontaxis, K. Bister, R. Konrat. The v-myc-induced Q83 Lipocalin Is a Siderocalin. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41646–41652.
- [68] W. R. Harris, C. J. Carrano, K. N. Raymond. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 16. Isolation, characterization, and formation constants of ferric aerobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 2722–2727.
- [69] K. Hantke, G. Nicholson, W. Rabsch, G. Winkelmann. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 3677–3682.
- [70] B. Bister, D. Bischoff, G. J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke, R. D. Sussmuth. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *BioMetals* **2004**, *17*, 471–481.
- [71] M. A. Fischbach, H. Lin, D. R. Liu, C. T. Walsh. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 571–576.
- [72] M. A. Fischbach, H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem, K. D. Smith. The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 16502–16507.
- [73] R. J. Abergel, E. G. Moore, R. K. Strong, K. N. Raymond. Microbial evasion of the immune system: structural modifications of enterobactin impair siderocalin recognition. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10998–10999.
- [74] M. Valdebenito, S. I. Müller, K. Hantke. Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin). *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *277*, 182–187.
- [75] A. T. Koppisch, S. Dhungana, K. K. Hill, H. Boukhalfa, H. S. Heine, L. A. Colip, R. B. Romero, Y. Shou, L. O. Ticknor, B. L. Marrone, L. E. Hersman, S. Iyer, C. E. Ruggiero. Petrobactin is produced by both pathogenic and non-pathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. *BioMetals* **2008**, *21*, 581–589.

- [76] M. K. Wilson, R. J. Abergel, J. E. Arceneaux, K. N. Raymond, B. R. Byers. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *BioMetals* **2010**, *23*, 129–134.
- [77] J. M. Roosenberg, II., Y. M. Lin, Y. Lu, M. J. Miller. Studies and syntheses of siderophores, microbial iron chelators, and analogs as potential drug delivery agents. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 159–197.
- [78] G. Benz, T. Schröder, J. Kurz, C. Wünsche, W. Karl, G. Steffens, J. Pfitzner, D. Schmidt. Konstitution der Desferriform der Albomycine δ_1 , δ_2 und ϵ . *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 552–553; Constitution of the Deferriform of the Albomycins δ_1 , δ_2 and ϵ . *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **1982**, *21*, 1322–1335.
- [79] H. Bickel, E. Gäumann, G. Nussberger, P. Reusser, E. Vischer, W. Voser, A. Wettstein, H. Zähner. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. 25. Mitteilung. Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrimycine A₁ und A₂, neuer Antibiotika der Sideromycin-Gruppe. *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 2105–2118.
- [80] L. Vértessy, W. Aretz, H.-W. Fehlhaber, H. Kogler. Salmycin A–D, Antibiotika aus *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, mit Siderophor-Aminoglycosid-Struktur. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 46–60.
- [81] M. J. Miller, H. Zhu, Y. Xu, C. Wu, A. J. Walz, A. Vergne, J. M. Roosenberg, G. Moraski, A. A. Minnick, J. McKee-Dolence, J. Hu, K. Fennell, E. Kurt Dolence, L. Dong, S. Franzblau, F. Malouin, U. Möllmann. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *BioMetals* **2009**, *22*, 61–75.
- [82] A. Pramanik, V. Braun. Albomycin uptake via a ferric hydroxamate transport system of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3878–3886.
- [83] A. D. Ferguson, V. Braun, H. P. Fiedler, J. W. Coulton, K. Diederichs, W. Welte. Crystal structure of the antibiotic albomycin in complex with the outer membrane transporter FhuA. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 956–963.
- [84] T. E. Clarke, V. Braun, G. Winkelmann, L. W. Tari, H. J. Vogel. X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13966–13972.
- [85] V. Braun, K. Günthner, K. Hantke, L. Zimmermann. Intracellular activation of albomycin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1983**, *156*, 308–315.
- [86] T. A. Wenciewicz, U. Möllmann, T. E. Long, M. J. Miller. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin "Trojan Horse" antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates. *BioMetals* **2009**, *22*, 633–648.
- [87] M. Ghosh, M. J. Miller. Design, synthesis, and biological evaluation of isocyanurate-based antifungal and macrolide antibiotic conjugates: iron transport-mediated drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1519–1525.
- [88] M. Ghosh, L. J. Lambert, P. W. Huber, M. J. Miller. Synthesis, bioactivity, and DNA-cleaving ability of desferrioxamine B-nalidixic acid and anthraquinone carboxylic acid conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2337–2340.
- [89] A. Ghosh, M. Ghosh, C. Niu, F. Malouin, U. Moellmann, M. J. Miller. Iron transport-mediated drug delivery using mixed-ligand siderophore- β -lactam conjugates. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 1011–1019.
- [90] M. Ghosh, M. J. Miller. Synthesis and in vitro antibacterial activity of spermidine-based mixed catechol- and hydroxamate-containing siderophore–vancomycin conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 43–48.
- [91] V. Braun. Active transport of siderophore-mimicking antibacterials across the outer membrane. *Drug Resist. Updates* **1999**, *2*, 363–369.
- [92] V. Braun, A. Pramanik, T. Gwinner, M. Köberle, E. Bohn. Sideromycins: tools and antibiotics. *BioMetals* **2009**, *22*, 3–13.

- [93] X. Thomas, D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, C. Afonso, A. Blond, N. Birlirakis, C. Goulard, L. Dubost, R. Thai, J. C. Tabet, S. Rebuffat. Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 28233–28242.
- [94] M. F. Azpiroz, M. Laviña. Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 1235–1241.
- [95] D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi, X. Thomas, C. Djediat, S. Rebuffat. Parasitism of iron-siderophore receptors of *Escherichia coli* by the siderophore-peptide microcin E492m and its unmodified counterpart. *BioMetals* **2006**, 19, 181–191.
- [96] G. Vassiliadis, D. Destoumieux-Garzon, C. Lombard, S. Rebuffat, J. Peduzzi. Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 288–297.
- [97] M. E. Poey, M. F. Azpiroz, M. Laviña. Comparative analysis of chromosome-encoded microcins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 1411–1418.
- [98] D. Destoumieux-Garzón, X. Thomas, M. Santamaria, C. Goulard, M. Barthélémy, B. Boscher, Y. Bessin, G. Molle, A. M. Pons, L. Letellier, J. Peduzzi, S. Rebuffat. Microcin E492 antibacterial activity: evidence for a TonB-dependent inner membrane permeabilization on *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **2003**, 49, 1031–1041.
- [99] A. Müller, A. J. Wilkinson, K. S. Wilson, A. K. Duhme-Klair. An $[\text{Fe}(\text{mecam})_2]^{6-}$ bridge in the crystal structure of a ferric enterobactin binding protein. *Angew. Chem.* **2006**, 118, 5256–5260; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5132–5136.
- [100] B. P. Hay, D. A. Dixon, R. Vargas, J. Garza, K. N. Raymond. Structural criteria for the rational design of selective ligands. 3. Quantitative structure-stability relationship for iron(III) complexation by tris-catecholamide siderophores. *Inorg. Chem.* **2001**, 40, 3922–3935.
- [101] M. C. Venuti, W. H. Rastetter, J. B. Neilands. 1,3,5-Tris(*N,N,N'*-2,3-dihydroxybenzoyl)amino-methylbenzene, a synthetic iron chelator related to enterobactin. *J. Med. Chem.* **1979**, 22, 123–124.
- [102] S. Heidinger, V. Braun, V. L. Pecoraro, K. N. Raymond. Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analogs of enterochelin. *J. Bacteriol.* **1983**, 153, 109–115.
- [103] D. J. Ecker, B. F. Matzanke, K. N. Raymond. Recognition and transport of ferric enterobactin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1986**, 167, 666–673.
- [104] B. F. Matzanke, D. J. Ecker, T. S. Yang, B. H. Huynh, G. Müller, K. N. Raymond. *Escherichia coli* iron enterobactin uptake monitored by Mössbauer spectroscopy. *J. Bacteriol.* **1986**, 167, 674–680.
- [105] J. B. Porter. Practical management of iron overload. *Br. J. Haematol.* **2001**, 115, 239–252.
- [106] M. D. Cappellini, P. Pattoneri. Oral iron chelators. *Annu. Rev. Med.* **2009**, 60, 25–38.
- [107] A. D. Ferguson, R. Chakraborty, B. S. Smith, L. Esser, D. van der Helm, J. Deisenhofer. Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **2002**, 295, 1715–1719.
- [108] K. D. Krewulak, H. J. Vogel. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1778, 1781–1804.
- [109] A. Sauter, V. Braun. Defined inactive FecA derivatives mutated in functional domains of the outer membrane transport and signaling protein of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **2004**, 186, 5303–5310.
- [110] N. Noinaj, M. Guillier, T. J. Barnard, S. K. Buchanan. TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, 64, 43–60.
- [111] B. C. Chu, R. S. Peacock, H. J. Vogel. Bioinformatic analysis of the TonB protein family. *BioMetals* **2007**, 20, 467–483.
- [112] D. C. Scott, Z. Cao, Z. Qi, M. Bauler, J. D. Igo, S. M. Newton, P. E. Klebba. Exchangeability of N termini in the ligand-gated porins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 13025–13033.

- [113] H. A. Eisenhauer, S. Shames, P. D. Pawelek, J. W. Coulton. Siderophore transport through *Escherichia coli* outer membrane receptor FhuA with disulfide-tethered cork and barrel domains. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30574–30580.
- [114] L. Ma, W. Kaserer, R. Annamalai, D. C. Scott, B. Jin, X. Jiang, Q. Xiao, H. Maymani, L. M. Massis, L. C. Ferreira, S. M. Newton, P. E. Klebba. Evidence of ball-and-chain transport of ferric enterobactin through FepA. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 397–406.
- [115] K. Schauer, B. Gouget, M. Carriere, A. Labigne, H. de Reuse. Novel nickel transport mechanism across the bacterial outer membrane energized by the TonB/ExbB/ExbD machinery. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 1054–1068.
- [116] H. Neugebauer, C. Herrmann, W. Kammer, G. Schwarz, A. Nordheim, V. Braun. ExbBD-dependent transport of maltodextrins through the novel MalA protein across the outer membrane of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 8300–8311.
- [117] K. Schauer, D. A. Rodionov, H. de Reuse. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 330–338.
- [118] C. Chang, A. Mooser, A. Plückthun, A. Wlodawer. Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27535–27540.
- [119] J. Ködding, P. Howard, L. Kaufmann, P. Polzer, A. Lustig, W. Welte. Dimerization of TonB is not essential for its binding to the outer membrane siderophore receptor FhuA of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 9978–9986.
- [120] J. Ködding, F. Killig, P. Polzer, S. P. Howard, K. Diederichs, W. Welte. Crystal structure of a 92-residue C-terminal fragment of TonB from *Escherichia coli* reveals significant conformational changes compared to structures of smaller TonB fragments. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3022–3028.
- [121] R. S. Peacock, A. M. Weljie, S. Peter Howard, F. D. Price, H. J. Vogel. The solution structure of the C-terminal domain of TonB and interaction studies with TonB box peptides. *J. Mol. Biol.* **2005**, *345*, 1185–1197.
- [122] K. Kampfenkel, V. Braun. Membrane topology of the *Escherichia coli* ExbD protein. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 5485–5487.
- [123] A. Garcia-Herrero, R. S. Peacock, S. P. Howard, H. J. Vogel. The solution structure of the periplasmic domain of the TonB system ExbD protein reveals an unexpected structural homology with siderophore-binding proteins. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 872–889.
- [124] D. D. Shultis, M. D. Purdy, C. N. Banchs, M. C. Wiener. Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science* **2006**, *312*, 1396–1399.
- [125] P. D. Pawelek, N. Croteau, C. Ng-Thow-Hing, C. M. Khursigara, N. Moiseeva, M. Allaire, J. W. Coulton. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **2006**, *312*, 1399–1402.
- [126] T. E. Clarke, S. Y. Ku, D. R. Dougan, H. J. Vogel, L. W. Tari. The structure of the ferric siderophore binding protein FhuD complexed with gallichrome. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 287–291.
- [127] D. M. Carter, I. R. Miousse, J. N. Gagnon, E. Martinez, A. Clements, J. Lee, M. A. Hancock, H. Gagnon, P. D. Pawelek, J. W. Coulton. Interactions between TonB from *Escherichia coli* and the periplasmic protein FhuD. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 35413–35424.
- [128] K. J. James, M. A. Hancock, J. N. Gagnon, J. W. Coulton. TonB interacts with BtuF, the *Escherichia coli* periplasmic binding protein for cyanocobalamin. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9212–9220.
- [129] T. Eitinger, D. A. Rodionov, M. Grote, E. Schneider. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 3–67.
- [130] A. L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle, J. Chen. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 317–364.
- [131] I. C. Sutcliffe, R. R. Russell. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 1123–1128.

- [132] E. Biemans-Oldehinkel, M. K. Doeven, B. Poolman. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1023–1035.
- [133] T. van der Heide, B. Poolman. ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 938–943.
- [134] G. Richarme, T. D. Caldas. Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 15607–15612.
- [135] R. Tam, M. H. Saier, Jr. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* **1993**, *57*, 320–346.
- [136] J. P. Claverys. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* **2001**, *152*, 231–243.
- [137] K. Fukami-Kobayashi, Y. Tateno, K. Nishikawa. Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 279–290.
- [138] M. E. Newcomer, G. L. Gilliland, F. A. Quijcho. L-Arabinose-binding protein-sugar complex at 2.4 Å resolution. Stereochemistry and evidence for a structural change. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 13213–13217.
- [139] N. Yao, P. S. Ledvina, A. Choudhary, F. A. Quijcho. Modulation of a salt link does not affect binding of phosphate to its specific active transport receptor. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2079–2085.
- [140] F. A. Quijcho, P. S. Ledvina. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **1996**, *20*, 17–25.
- [141] E. L. Borths, K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16642–16647.
- [142] R. P. Berntsson, S. H. Smits, L. Schmitt, D. J. Slotboom, B. Poolman. A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2606–2617.
- [143] X. Duan, F. A. Quijcho. Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochemistry* **2002**, *41*, 706–712.
- [144] B. H. Oh, J. Pandit, C. H. Kang, K. Nikaido, S. Gokcen, G. F. Ames, S. H. Kim. Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11348–11355.
- [145] Y. H. Lee, M. R. Dorwart, K. R. Hazlett, R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, C. A. Hasemann. The crystal structure of Zn(II)-free *Treponema pallidum* TroA, a periplasmic metal-binding protein, reveals a closed conformation. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 2300–2304.
- [146] B. Mao, M. R. Pear, J. A. McCammon, F. A. Quijcho. Hinge-bending in L-arabinose-binding protein. The "Venus's flytrap" model. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 1131–1133.
- [147] S. Trakhanov, N. K. Vyas, H. Luecke, D. M. Kristensen, J. Ma, F. A. Quijcho. Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* **2005**, *44*, 6597–6608.
- [148] A. J. Sharff, L. E. Rodseth, J. C. Spurlino, F. A. Quijcho. Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10657–10663.
- [149] M. M. Flocco, S. L. Mowbray. The 1.9 Å X-ray structure of a closed unliganded form of the periplasmic glucose/galactose receptor from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8931–8936.
- [150] A. Wolf, E. W. Shaw, K. Nikaido, G. F. Ames. The histidine-binding protein undergoes conformational changes in the absence of ligand as analyzed with conformation-specific monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23051–23058.

- [151] P. S. Ledvina, A. L. Tsai, Z. Wang, E. Koehl, F. A. Quiocho. Dominant role of local dipolar interactions in phosphate binding to a receptor cleft with an electronegative charge surface: equilibrium, kinetic, and crystallographic studies. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2550–2559.
- [152] C. Tang, C. D. Schwieters, G. M. Clore. Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* **2007**, *449*, 1078–1082.
- [153] F. A. Quiocho, J. C. Spurlino, L. E. Rodseth. Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor. *Structure* **1997**, *5*, 997–1015.
- [154] Y. H. Lee, R. K. Deka, M. V. Norgard, J. D. Radolf, C. A. Hasemann. *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 628–633.
- [155] R. Shi, A. Proteau, J. Wagner, Q. Cui, E. O. Purisima, A. Matte, M. Cygler. Trapping open and closed forms of FitE: a group III periplasmic binding protein. *Proteins* **2009**, *75*, 598–609.
- [156] J. C. Grigg, J. D. Cooper, J. Cheung, D. E. Heinrichs, M. E. Murphy. The *Staphylococcus aureus* siderophore receptor HtsA undergoes localized conformational changes to enclose staphyloferrin A in an arginine-rich binding pocket. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11162–11171.
- [157] K. D. Krewulak, C. M. Shepherd, H. J. Vogel. Molecular dynamics simulations of the periplasmic ferric-hydroxamate binding protein FhuD. *BioMetals* **2005**, *18*, 375–386.
- [158] N. K. Karpowich, H. H. Huang, P. C. Smith, J. F. Hunt. Crystal structures of the BtuF periplasmic-binding protein for vitamin B12 suggest a functionally important reduction in protein mobility upon ligand binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8429–8434.
- [159] J. C. Grigg, J. Cheung, D. E. Heinrichs, M. E. Murphy. Specificity of Staphyloferrin B recognition by the SirA receptor from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34579–34588.
- [160] C. Kandt, Z. Xu, D. P. Tieleman. Opening and closing motions in the periplasmic vitamin B12 binding protein BtuF. *Biochemistry* **2006**, *45*, 13284–13292.
- [161] M. Liu, J. G. Su, R. Kong, T. G. Sun, J. J. Tan, W. Z. Chen, C. X. Wang. Molecular dynamics simulations of the bacterial periplasmic heme binding proteins ShuT and PhuT. *Biophys. Chem.* **2008**, *138*, 42–49.
- [162] M. T. Sebulsky, C. D. Speziali, B. H. Shilton, D. R. Edgell, D. E. Heinrichs. FhuD1, a ferric hydroxamate-binding lipoprotein in *Staphylococcus aureus*: a case of gene duplication and lateral transfer. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53152–53159.
- [163] M. T. Sebulsky, B. H. Shilton, C. D. Speziali, D. E. Heinrichs. The role of FhuD2 in iron(III)-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. Demonstration that FhuD2 binds iron(III)-hydroxamates but with minimal conformational change and implication of mutations on transport. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 49890–49900.
- [164] A. Mademidis, H. Killmann, W. Kraas, I. Flechsler, G. Jung, V. Braun. ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane/cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 1109–1123.
- [165] K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees. The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **2002**, *296*, 1091–1098.
- [166] V. Braun, C. Herrmann. Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 6913–6918.
- [167] R. N. Hvorup, B. A. Goetz, M. Niederer, K. Hollenstein, E. Perozo, K. P. Locher. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science* **2007**, *317*, 1387–1390.
- [168] M. C. Lawrence, P. A. Pilling, V. C. Epa, A. M. Berry, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton. The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure* **1998**, *6*, 1553–1561.

- [169] X. Sun, H. M. Baker, R. Ge, H. Sun, Q. Y. He, E. N. Baker. Crystal structure and metal binding properties of the lipoprotein MtsA, responsible for iron transport in *Streptococcus pyogenes*. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6184–6190.
- [170] E. Schneider, S. Hunke. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *22*, 1–20.
- [171] A. L. Davidson, J. Chen. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 241–268.
- [172] R. J. Dawson, K. Hollenstein, K. P. Locher. Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 250–257.
- [173] G. Lu, J. M. Westbrook, A. L. Davidson, J. Chen. ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17969–17974.
- [174] P. C. Smith, N. Karpowich, L. Millen, J. E. Moody, J. Rosen, P. J. Thomas, J. F. Hunt. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 139–149.
- [175] J. Chen, G. Lu, J. Lin, A. L. Davidson, F. A. Quijcho. A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 651–661.
- [176] M. L. Oldham, D. Khare, F. A. Quijcho, A. L. Davidson, J. Chen. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **2007**, *450*, 515–521.
- [177] K. Hollenstein, D. C. Frei, K. P. Locher. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **2007**, *446*, 213–216.
- [178] R. J. Dawson, K. P. Locher. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **2006**, *443*, 180–185.
- [179] K. Hollenstein, R. J. Dawson, K. P. Locher. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 412–418.
- [180] K. P. Locher. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 239–245.
- [181] N. Baichoo, J. D. Helmann. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 5826–5832.
- [182] E. Pohl, J. C. Haller, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, E. Garman, M. L. Vasil. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 903–915.
- [183] M. A. Sheikh, G. L. Taylor. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 1208–1220.
- [184] N. Baichoo, T. Wang, R. Ye, J. D. Helmann. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 1613–1629.
- [185] J. Ollinger, K. B. Song, H. Antelmann, M. Hecker, J. D. Helmann. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3664–3673.
- [186] A. Gaballa, H. Antelmann, C. Aguilar, S. K. Khakh, K. B. Song, G. T. Smaldone, J. D. Helmann. The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 11927–11932.
- [187] F. Kunst, N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessi eres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. D usterh oft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S.-Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppe, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. H enaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M.-F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber,

- V. Lazarevic, S.-M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauël, C. Médigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S.-H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan, P. Pujic, B. Purnelle, G. Rapoport, M. Rey, S. Reynolds, M. Rieger, C. Rivolta, E. Rocha, B. Roche, M. Rose, Y. Sadaie, T. Sato, E. Scanian, S. Schleich, R. Schroeter, F. Scoffone, J. Sekiguchi, A. Sekowska, S. J. Seror, P. Serror, B.-S. Shin, B. Soldo, A. Sorokin, E. Tacconi, T. Takagi, H. Takahashi, K. Takemaru, M. Takeuchi, A. Tamakoshi, T. Tanaka, P. Terpstra, A. Tognoni, V. Tosato, S. Uchiyama, M. Vandenbol, F. Vannier, A. Vassarotti, A. Viari, R. Wambutt, E. Wedler, H. Wedler, T. Weitzenegger, P. Winters, A. Wipat, H. Yamamoto, K. Yamane, K. Yasumoto, K. Yata, K. Yoshida, H.-F. Yoshikawa, E. Zumstein, H. Yoshikawa, A. Danchin. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **1997**, *390*, 249–256.
- [188] V. Barbe, S. Cruveiller, F. Kunst, P. Lenoble, G. Meurice, A. Sekowska, D. Vallenet, T. Wang, I. Moszer, C. Medigue, A. Danchin. From a consortium sequence to a unified sequence: the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology* **2009**, *155*, 1758–1775.
- [189] M. Miethke, S. Schmidt, M. A. Marahiel. The major facilitator superfamily-type transporter YmfE and the multidrug-efflux activator Mta mediate bacillibactin secretion in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 5143–5152.
- [190] N. N. Baranova, A. Danchin, A. A. Neyfakh. Mta, a global MerR-type regulator of the *Bacillus subtilis* multidrug-efflux transporters. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1549–1559.
- [191] M. Miethke, O. Klotz, U. Linne, J. J. May, C. L. Beckering, M. A. Marahiel. Ferri-bacillibactin uptake and hydrolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1413–1427.
- [192] A. Gaballa, J. D. Helmann. Substrate induction of siderophore transport in *Bacillus subtilis* mediated by a novel one-component regulator. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 164–173.
- [193] M. Miethke, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg **2007**.
- [194] O. Klotz, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg **2006**.
- [195] T. Ito, J. B. Neilands. Products of “Low-iron Fermentation” with *Bacillus subtilis*: Isolation, Characterization and Synthesis of 2,3-Dihydroxybenzoylglycine. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4645–4647.
- [196] W. J. Peters, R. A. Warren. Itoic acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **1968**, *95*, 360–366.
- [197] B. R. Byers, C. E. Lankford. Regulation of synthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in *Bacillus subtilis* by iron and a biological secondary hydroxamate. *Biochim. Biophys. Acta* **1968**, *165*, 563–566.
- [198] R. Schneider, K. Hantke. Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein-dependent transport system. *Mol. Microbiol.* **1993**, *8*, 111–121.
- [199] F. Peuckert, M. Miethke, A. G. Albrecht, L.-O. Essen, M. A. Marahiel. Strukturbasis und Stereochemie der Triscatechol-Siderophor-Bindung durch FeuA. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8066–8069; Structural basis and stereochemistry of triscatecholate siderophore binding by FeuA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7924–7927.
- [200] N. Bugdahn, F. Peuckert, A. G. Albrecht, M. Miethke, M. A. Marahiel, M. Oberthür. Direkte Identifizierung eines Siderophor-Importproteins durch synthetische Petrobactin-Liganden. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10408–10411; Direct Identification of a Siderophore Import Protein Using Synthetic Petrobactin Ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 10210–10213.
- [201] D. G. Cooper, C. R. Macdonald, S. J. Duff, N. Kosaric. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42*, 408–412.
- [202] F. W. Studier, B. A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130.
- [203] J. Grodberg, J. J. Dunn. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 1245–1253.

- [204] J. Stülke, R. Hanschke, M. Hecker. Temporal activation of β -glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *J. Gen. Microbiol.* **1993**, 139, 2041–2045.
- [205] P. Schaeffer, J. Millet, J. P. Aubert. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1965**, 54, 704–711.
- [206] C. Anagnostopoulos, J. Spizizen. Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **1961**, 81, 741–746.
- [207] J. A. Hoch. Genetic analysis in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **1991**, 204, 305–320.
- [208] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, 51, 263–273.
- [209] K. B. Mullis, F. A. Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **1987**, 155, 335–350.
- [210] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, 239, 487–491.
- [211] K. B. Mullis. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **1990**, 48, 579–582.
- [212] H. C. Birnboim, J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 1513–1523.
- [213] H. C. Birnboim. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **1983**, 100, 243–255.
- [214] B. Vogelstein, D. Gillespie. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 615–619.
- [215] K. Hamaguchi, E. P. Geiduschek. The Effect of Electrolytes on the Stability of the Deoxyribonucleate Helix. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, 84, 1329–1338.
- [216] J. Sambrook, F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **1989**.
- [217] C. Klein, C. Kaletta, N. Schnell, K. D. Entian. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 132–142.
- [218] A. Wach. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **1996**, 12, 259–265.
- [219] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **1975**, 258, 598–599.
- [220] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **1987**, 411, 177–184.
- [221] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680–685.
- [222] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, 20, 3551–3567.
- [223] M. Wigger, J. P. Nawrocki, C. H. Watson, J. R. Eyler, S. A. Benner. Assessing enzyme substrate specificity using combinatorial libraries and electrospray ionization-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spec.* **1997**, 11, 1749–1752.
- [224] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson, G. S. Jackson. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, 1–35.
- [225] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- [226] E. Layne. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* **1957**, 3, 447–454.
- [227] S. C. Gill, P. H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 319–326.

- [228] S. M. Kelly, N. C. Price. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, *1*, 349–384.
- [229] N. J. Greenfield. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Anal. Biochem.* **1996**, *235*, 1–10.
- [230] A. Royant, P. Carpentier, J. Ohana, J. McGeehan, B. Paetzold, M. Noirclerc-Savoye, X. Vernède, V. Adam, D. Bourgeois. Advances in spectroscopic methods for biological crystals. 1. Fluorescence lifetime measurements. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 1105–1112.
- [231] J. McGeehan, R. B. Ravelli, J. W. Murray, R. L. Owen, F. Cipriani, S. McSweeney, M. Weik, E. F. Garman. Colouring cryo-cooled crystals: online microspectrophotometry. *J. Synchrotron Radiat.* **2009**, *16*, 163–172.
- [232] J. Jancarik, S.-H. Kim. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409–411.
- [233] A. G. Leslie. The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 48–57.
- [234] W. Kabsch. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 125–132.
- [235] CCP4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763.
- [236] S. E. Brenner, C. Chothia, T. J. Hubbard. Population statistics of protein structures: lessons from structural classifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 369–376.
- [237] C. Sander, R. Schneider. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins* **1991**, *9*, 56–68.
- [238] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- [239] P. Emsley, K. Cowtan. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- [240] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- [241] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255.
- [242] A. T. Brünger. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **1992**, *355*, 472–475.
- [243] A. T. Brünger. Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1993**, *49*, 24–36.
- [244] A. Wlodawer, W. Minor, Z. Dauter, M. Jaskolski. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1–21.
- [245] C. S. Bond, A. W. Schüttelkopf. ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 510–512.
- [246] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10037–10041.
- [247] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- [248] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytseis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T. L. Madden. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W5–W9.
- [249] L. Holm, C. Sander. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 123–138.
- [250] L. Holm, P. Rosenstrom. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W545–549.
- [251] J. J. Ward, J. S. Sodhi, L. J. McGuffin, B. F. Buxton, D. T. Jones. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 635–645.

- [252] J. J. Ward, L. J. McGuffin, K. Bryson, B. F. Buxton, D. T. Jones. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* **2004**, *20*, 2138–2139.
- [253] G. J. Kleywegt, T. A. Jones. Databases in protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1998**, *54*, 1119–1131.
- [254] G. J. Kleywegt, K. Henrick, E. J. Dodson, D. M. van Aalten. Pound-wise but penny-foolish: How well do micromolecules fare in macromolecular refinement? *Structure* **2003**, *11*, 1051–1059.
- [255] G. J. Kleywegt. Crystallographic refinement of ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 94–100.
- [256] A. S. Juncker, H. Willenbrock, G. Von Heijne, S. Brunak, H. Nielsen, A. Krogh. Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1652–1662.
- [257] O. Rahman, S. Cummings, D. Harrington, I. Sutcliffe. Methods for the bioinformatic identification of bacterial lipoproteins encoded in the genomes of Gram-positive bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 2377–2382.
- [258] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- [259] A. W. Schüttelkopf, D. M. van Aalten. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 1355–1363.
- [260] D. T. Jones. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 195–202.
- [261] K. Bryson, L. J. McGuffin, R. L. Marsden, J. J. Ward, J. S. Sodhi, D. T. Jones. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, W36–W38.
- [262] Schrödinger, LLC, **2010**.
- [263] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1–6.
- [264] J. D. Bendtsen, H. Nielsen, G. von Heijne, S. Brunak. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **2004**, *340*, 783–795.
- [265] O. Emanuelsson, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 953–971.
- [266] E. Krissinel, K. Henrick. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 2256–2268.
- [267] C. Notredame, D. G. Higgins, J. Heringa. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 205–217.
- [268] A. Skerra, T. G. Schmidt. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **2000**, *326*, 271–304.
- [269] A. M. Zawadzka, Y. Kim, N. Maltseva, R. Nichiporuk, Y. Fan, A. Joachimiak, K. N. Raymond. Characterization of a *Bacillus subtilis* transporter for petrobactin, an anthrax stealth siderophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 21854–21859.
- [270] I. C. Sutcliffe, D. J. Harrington. Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* **2002**, *148*, 2065–2077.
- [271] M. I. Hutchings, T. Palmer, D. J. Harrington, I. C. Sutcliffe. Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 13–21.
- [272] M. Miethke, A. Skerra. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin expresses antimicrobial activity by interfering with L-norepinephrine-mediated bacterial iron acquisition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1580–1589.
- [273] R. J. Abergel, A. M. Zawadzka, T. M. Hoette, K. N. Raymond. Enzymatic hydrolysis of trilactone siderophores: where chiral recognition occurs in enterobactin and bacillibactin iron transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12682–12692.

- [274] T. B. Karpishin, K. N. Raymond. Die erste strukturelle Charakterisierung eines Metall–Enterobactin-Komplexes: $[V(\text{enterobactin})]^{2-}$. *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 486–488; The First Structural Characterization of a Metal–Enterobactin Complex: $[V(\text{enterobactin})]^{2-}$. *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.* **1992**, *31*, 466–468.
- [275] T. B. Karpishin, T. M. Dewey, K. N. Raymond. Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport. 49. The Vanadium(IV) Enterobactin Complex - Structural, Spectroscopic, and Electrochemical Characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1842–1851.
- [276] M. E. Bluhm, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond. Corynebactin and enterobactin: related siderophores of opposite chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2436–2437.
- [277] M. E. Bluhm, B. P. Hay, S. S. Kim, E. A. Dertz, K. N. Raymond. Corynebactin and a serine trilactone based analogue: chirality and molecular modeling of ferric complexes. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5475–5478.
- [278] A. M. Zawadzka, R. J. Abergel, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, K. N. Raymond. Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*: Identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry* **2009**, *48*, 3645–3657.
- [279] R. A. Gardner, R. Kinkade, C. Wang, O. Phanstiel IV. Total synthesis of petrobactin and its homologues as potential growth stimuli for *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, an oil-degrading bacteria. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3530–3537.
- [280] K. Barbeau, E. L. Rue, K. W. Bruland, A. Butler. Photochemical cycling of iron in the surface ocean mediated by microbial iron(III)-binding ligands. *Nature* **2001**, *413*, 409–413.
- [281] K. Barbeau. Photochemistry of organic iron(III) complexing ligands in oceanic systems. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 1505–1516.
- [282] M. Sandy, A. Butler. Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4580–4595.
- [283] R. J. Abergel, A. M. Zawadzka, K. N. Raymond. Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2124–2125.
- [284] S. A. Amin, D. H. Green, M. C. Hart, F. C. Kupper, W. G. Sunda, C. J. Carrano. Photolysis of iron–siderophore chelates promotes bacterial–algal mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 17071–17076.
- [285] J. M. Vraspir, A. Butler. Chemistry of marine ligands and siderophores. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **2009**, *1*, 43–63.
- [286] T. D. Read, S. N. Peterson, N. Tourasse, L. W. Baillie, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, H. Tettelin, D. E. Fouts, J. A. Eisen, S. R. Gill, E. K. Holtzapple, O. A. Økstad, E. Helgason, J. Rillstone, M. Wu, J. F. Kolonay, M. J. Beanan, R. J. Dodson, L. M. Brinkac, M. Gwinn, R. T. DeBoy, R. Madpu, S. C. Daugherty, A. S. Durkin, D. H. Haft, W. C. Nelson, J. D. Peterson, M. Pop, H. M. Khouri, D. Radune, J. L. Benton, Y. Mahamoud, L. Jiang, I. R. Hance, J. F. Weidman, K. J. Berry, R. D. Plaut, A. M. Wolf, K. L. Watkins, W. C. Nierman, A. Hazen, R. Cline, C. Redmond, J. E. Thwaite, O. White, S. L. Salzberg, B. Thomason, A. M. Friedlander, T. M. Koehler, P. C. Hanna, A.-B. Kolstø, C. M. Fraser. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **2003**, *423*, 81–86.
- [287] N. Ivanova, A. Sorokin, I. Anderson, N. Gilleron, B. Candelon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltsman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek, N. Kyrpides. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **2003**, *423*, 87–91.
- [288] D. D. Doorneweerd, W. A. Henne, R. G. Reifemberger, P. S. Low. Selective capture and identification of pathogenic bacteria using an immobilized siderophore. *Langmuir* **2010**, *26*, 15424–15429.
- [289] G. Zhang, S. A. Amin, F. C. Kupper, P. D. Holt, C. J. Carrano, A. Butler. Ferric stability constants of representative marine siderophores: marinobactins, aquachelins, and petrobactin. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 11466–11473.

- [290] B. C. H. Chu, H. J. Vogel. A structural and functional analysis of type III periplasmic and substrate binding proteins: their role in bacterial siderophore and heme transport. *Biol. Chem.* **2011**, 392, 39–52.
- [291] Y. Quentin, G. Fichant, F. Denizot. Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems. *J. Mol. Biol.* **1999**, 287, 467–484.
- [292] D. Mattle, A. Zeltina, J. S. Woo, B. A. Goetz, K. P. Locher. Two stacked heme molecules in the binding pocket of the periplasmic heme-binding protein HmuT from *Yersinia pestis*. *J. Mol. Biol.* **2010**, 404, 220–231.
- [293] J. C. Grigg, C. L. Vermeiren, D. E. Heinrichs, M. E. Murphy. Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 28815–28822.
- [294] T. E. Clarke, M. R. Rohrbach, L. W. Tari, H. J. Vogel, W. Koster. Ferric hydroxamate binding protein FhuD from *Escherichia coli*: mutants in conserved and non-conserved regions. *BioMetals* **2002**, 15, 121–131.
- [295] C. Kandt, D. P. Tieleman. Holo-BtuF stabilizes the open conformation of the vitamin B12 ABC transporter BtuCD. *Proteins* **2010**, 78, 738–753.
- [296] C. Sprencel, Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. N. Raymond, S. M. Newton, P. E. Klebba. Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB. *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5359–5364.
- [297] M. R. Rohrbach, V. Braun, W. Koster. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* **1995**, 177, 7186–7193.
- [298] W. W. Ho, H. Li, S. Eakanunkul, Y. Tong, A. Wilks, M. Guo, T. L. Poulos. Holo- and apo-bound structures of bacterial periplasmic heme-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 35796–35802.
- [299] J. B. Neilands, T. J. Erickson, W. H. Rastetter. Stereospecificity of the ferric enterobactin receptor of *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 3831–3832.
- [300] P. Thulasiraman, S. M. Newton, J. Xu, K. N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M. A. Montague, P. E. Klebba. Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 6689–6696.
- [301] N. A. Larsen, H. Lin, R. Wei, M. A. Fischbach, C. T. Walsh. Structural characterization of enterobactin hydrolase IroE. *Biochemistry* **2006**, 45, 10184–10190.
- [302] M. Miethke. *Persönliche Mitteilung* **2011**.
- [303] G. L. Griffiths, S. P. Sigel, S. M. Payne, J. B. Neilands. Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 383–385.
- [304] S. I. Patzer, V. Braun. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J. Bacteriol.* **2010**, 192, 426–435.
- [305] M. Sandy, A. Han, J. Blunt, M. Munro, M. Haygood, A. Butler. Vanchrobactin and anguibactin siderophores produced by *Vibrio* sp. DS40M4. *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 1038–1043.
- [306] M. T. Anderson, S. K. Armstrong. The *Bordetella* bfe system: growth and transcriptional response to siderophores, catechols, and neuroendocrine catecholamines. *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 5731–5740.
- [307] M. T. Anderson, S. K. Armstrong. Norepinephrine mediates acquisition of transferrin-iron in *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 3940–3947.
- [308] S. M. Sandrini, R. Shergill, J. Woodward, R. Muralikuttan, R. D. Haigh, M. Lyte, P. P. Freestone. Elucidation of the mechanism by which catecholamine stress hormones liberate iron from the innate immune defense proteins transferrin and lactoferrin. *J. Bacteriol.* **2010**, 192, 587–594.
- [309] R. J. Abergel, J. A. Warner, D. K. Shuh, K. N. Raymond. Enterobactin protonation and iron release: structural characterization of the salicylate coordination shift in ferric enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8920–8931.

- [310] S. M. Cohen, M. Meyer, K. N. Raymond. Enterobactin Protonation and Iron Release: Hexadentate Tris-Salicylate Ligands as Models for Triprotonated Ferric Enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6277–6286.
- [311] E. Loisel, L. Jacquamet, L. Serre, C. Bauvois, J. L. Ferrer, T. Vernet, A. M. Di Guilmi, C. Durmort. AdcAll, a new pneumococcal Zn-binding protein homologous with ABC transporters: biochemical and structural analysis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 594–606.
- [312] M. Oke, L. G. Carter, K. A. Johnson, H. Liu, S. A. McMahon, X. Yan, M. Kerou, N. D. Weikart, N. Kadi, M. A. Sheikh, S. Schmelz, M. Dorward, M. Zawadzki, C. Cozens, H. Falconer, H. Powers, I. M. Overton, C. A. van Niekerk, X. Peng, P. Patel, R. A. Garrett, D. Prangishvili, C. H. Botting, P. J. Coote, D. T. Dryden, G. J. Barton, U. Schwarz-Linek, G. L. Challis, G. L. Taylor, M. F. White, J. H. Naismith. The Scottish Structural Proteomics Facility: targets, methods and outputs. *J. Struct. Funct. Genomics* **2010**, *11*, 167–180.
- [313] F. C. Beasley, E. D. Vines, J. C. Grigg, Q. Zheng, S. Liu, G. A. Lajoie, M. E. Murphy, D. E. Heinrichs. Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *72*, 947–963.
- [314] C. Linke, T. T. Caradoc-Davies, P. G. Young, T. Proft, E. N. Baker. The laminin-binding protein Lbp from *Streptococcus pyogenes* is a zinc receptor. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 5814–5823.
- [315] P. Ragunathan, B. Spellerberg, K. Ponnuraj. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of laminin-binding protein (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2009**, *65*, 492–494.
- [316] P. Ragunathan, B. Spellerberg, K. Ponnuraj. Structure of laminin-binding adhesin (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 1262–1269.
- [317] V. Rukhman, R. Anati, M. Melamed-Frank, N. Adir. The MntC crystal structure suggests that import of Mn^{2+} in cyanobacteria is redox controlled. *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 961–969.
- [318] S. Banerjee, B. Wei, M. Bhattacharyya-Pakrasi, H. B. Pakrasi, T. J. Smith. Structural determinants of metal specificity in the zinc transport protein ZnuA from *Synechocystis* 6803. *J. Mol. Biol.* **2003**, *333*, 1061–1069.
- [319] B. Wei, A. M. Randich, M. Bhattacharyya-Pakrasi, H. B. Pakrasi, T. J. Smith. Possible regulatory role for the histidine-rich loop in the zinc transport protein, ZnuA. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8734–8743.
- [320] B. R. Chandra, M. Yogavel, A. Sharma. Structural analysis of ABC-family periplasmic zinc binding protein provides new insights into mechanism of ligand uptake and release. *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 970–982.
- [321] H. Li, G. Jögl. Crystal structure of the zinc-binding transport protein ZnuA from *Escherichia coli* reveals an unexpected variation in metal coordination. *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 1358–1366.
- [322] L. A. Yatsunyk, J. A. Easton, L. R. Kim, S. A. Sugarbaker, B. Bennett, R. M. Breece, I. I. Vorontsov, D. L. Tierney, M. W. Crowder, A. C. Rosenzweig. Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 271–288.
- [323] A. G. Albrecht, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg **2007**.
- [324] A. G. Albrecht, D. J. Netz, M. Miethke, A. J. Pierik, O. Burghaus, F. Peuckert, R. Lill, M. A. Marahiel. SufU is an essential iron-sulfur cluster scaffold protein in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1643–1651.
- [325] T. M. Garrett, T. J. McMurry, M. W. Hosseini, Z. E. Reyes, F. E. Hahn, K. N. Raymond. Synthesis and Characterization of Macrobicyclic Iron(III) Sequestering Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2965–2977.
- [326] Y. Tor, J. Libman, A. Shanzer, C. E. Felder, S. Lifson. Chiral Siderophore Analogs: Enterobactin. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6661–6671.

Anhang

Tabelle A-1: Einteilung der Substratbindungsproteine in Cluster nach Tam und Saier.^[135]

Cluster	Substrate
1	Malto-Oligosaccharide, multiple Zucker, α -Glycerolphosphat und Eisen
2	Hexosen und Pentosen
3	polare Aminosäuren und Opine
4	aliphatische Aminosäuren und Amide
5	Peptide und Nickel
6	anorganische Polyanionen
7	organische Polyanionen
8	Eisenkomplexe und Vitamin B ₁₂
9	Mangan und Zink

Tabelle A-2: Einteilung der Substratbindungsproteine in Klassen nach Fukami-Kobayashi *et al.*^[137]

Klasse	Anzahl der Interdomänenverbindungen	Topologie der β -Faltblätter
I	3	β_2 - β_1 - β_3 - β_4 - β_5
II	2	β_2 - β_1 - β_3 - β_n - β_4 ^[a]
III	1	— ^[b]

[a] β_n repräsentiert den Strang, der der ersten Überkreuzung der N- und C-terminalen Domäne folgt und umgekehrt.

[b] Klasse III wurde erst nachträglich hinzugefügt, daher wurde in der Originalarbeit die Topologie der β -Faltblätter nicht definiert.

Tabelle A-3: Einteilung der Substratbindungsproteine in Cluster nach Berntsson *et al.*^[142]

Cluster	Substrate	Klassifizierung nach [137]
A-I	Metallionen	Klasse III
A-II	Siderophore	Klasse III
B	Kohlenhydrate, Leu, Ile, Val	Klasse I
C	Di- und Oligopeptide, Arg, Cellobiose, Nickel	Klasse II
D-I	Kohlenhydrate	Klasse II
D-II	Putrescin, Thiamin	Klasse II
D-III	Tetraedrische Oxyanionen	Klasse II
D-IV	Eisenionen	Klasse II
E	Sialsäure, 2-Ketosäuren, Ectoin, Pyroglutaminsäure	Klasse II
F-I	trigonal-planare Anionen, unbekannte Liganden	Klasse II
F-II	Methionin	Klasse II
F-III	kompatible Solute	Klasse II
F-IV	Aminosäuren	Klasse III

Tabelle A-4: Strukturell charakterisierte Substratbindungsproteine der Klasse III.

Protein	Organismus	Ligand	Auflösung	PDB-Code	Literatur
AdcAll	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Zn ^{II}	2.40 Å	3CX3	[311]
BSU3320	<i>Bacillus subtilis</i>	–	2.60 Å	3G9Q	–
		–	3.20 Å	3HXP	–
BtuF	<i>Escherichia coli</i>	–	2.00 Å	1N4D	[158]
		–	2.60 Å	2QI9	[167]
		Vitamin B ₁₂	2.00 Å	1N2Z	[141]
		Vitamin B ₁₂	2.00 Å	1N4A	[158]
CeuE	<i>Campylobacter jejuni</i>	mecam	2.40 Å	2CHU	[99]
DesE	<i>Streptomyces coelicolor</i>	–	1.50 Å	2X4L	[312]
FhuD	<i>Escherichia coli</i>	Gallichrom	1.90 Å	1EFD	[126]
		Albomycin δ ₂	2.60 Å	1K7S	[84]
		Desferal	1.97 Å	1K2V	[84]
		Coprogen	2.00 Å	1ESZ	[84]
FitE	<i>Escherichia coli</i>	–	1.82 Å	3BE6	[155]
		–	2.20 Å	3BE5	[155]
FpiA	<i>Bacillus subtilis</i>	–	1.75 Å	3GFV	[269]
HmuT	<i>Yersinia pestis</i>	–	1.50 Å	3MD9	[292]
		2 Häm	2.50 Å	3NU1	[292]
HtsA	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	1.35 Å	3EIX	[313]
		–	1.60 Å	3EIW	[313]
		Staphyloferrin A	2.20 Å	3LI2	[156]

		Staphyloferrin A	1.30 Å	3LHS	[156]
IsdE	<i>Staphylococcus aureus</i>	Häm	2.15 Å	2Q8Q	[293]
		Häm	1.95 Å	2Q8P	[293]
Lbp	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Zn ^{II}	2.45 Å	3GI1	[314]
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Zn ^{II}	2.50 Å	3HJT	[315-316]
MntC	<i>Synechocystis</i> sp. pcc 6803	Mn ^{II}	2.90 Å	1XVL	[317]
MtsA	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Fe ^{II}	1.87 Å	3HH8	[169]
PhuT	<i>Shigella dysenteriae</i>	–	2.05 Å	2RG7	[298]
		Häm	2.05 Å	2R7A	[298]
PsaA	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Zn ^{II}	2.00 Å	1PSZ	[168]
ShuT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Häm	2.40 Å	2R79	[298]
SirA	<i>Staphylococcus aureus</i>	–	2.10 Å	3MWG	[159]
		Staphyloferrin B	1.70 Å	3MWF	[159]
TM0189	<i>Thermotoga maritima</i>	–	1.70 Å	2ETV	–
TroA	<i>Treponema pallidum</i>	–	2.50 Å	1K0F	[145]
		Zn ^{II}	1.80 Å	1TOA	[154]
YcdH	<i>Bacillus subtilis</i>	Mn ^{II}	2.60 Å	2O1E	–
ZnuA	<i>Synechocystis</i> sp. pcc 6803	Zn ^{II}	1.90 Å	1PQ4	[318]
		–	2.50 Å	2OV1	[319]
		Zn ^{II}	2.40 Å	2OV3	[319]
	<i>Escherichia coli</i>	Zn ^{II}	1.83 Å	2OGW	[320]
		Zn ^{II}	1.75 Å	2OSV	[321]
		Co ^{II}	2.15 Å	2PS9	[322]
		–	2.47 Å	2PS3	[322]
		Zn ^{II}	2.00 Å	2PS0	[322]
		Zn ^{II}	1.70 Å	2PRS	[322]

Stand: 11.03.2011. Basierend auf ^[142] und ^[290], erweitert durch Abgleich von FeuA mit dem DALI-Server. ^[250]

Tabelle A-5: Strukturell charakterisierte SBP der Klasse III (FhuD-ähnlich) mit zusätzlichem β -Faltblatt am N-Terminus.

Protein	Organismus	PDB-Code	Reste	Kristallkontakt?
CeuE	<i>Campylobacter jejuni</i>	2CHU	24-50	geringfügig
BSU3320	<i>Bacillus subtilis</i>	3HXP	45-56	nein
DesE	<i>Streptomyces coelicolor</i>	2X4L	52-69	geringfügig
FitE	<i>Escherichia coli</i>	3BE5, 3BE6	19-38	ja
HtsA	<i>Staphylococcus aureus</i>	3EIX, 3EIW,	36-54	ja
		3LI2, 3LHS	36-54	geringfügig
SirA	<i>Staphylococcus aureus</i>	3MWF	37-51	ja
TM0189	<i>Thermotoga maritima</i>	2ETV	26-38	ja
(+ His ₆ -Tag)				

Tabelle A-6: Verwandtschaftsgrad der in Abb. 5-3 verglichenen Proteine zu FeuA.

Protein	Identität/Ähnlichkeit	E-Wert	UniProt-Code	Organismus
CeuE	28%/54%	$2 \cdot 10^{-7}$	Q0P8Q4	<i>Campylobacter jejuni</i>
FpiA	28%/48%	$7 \cdot 10^{-16}$	P94421	<i>Bacillus subtilis</i>
FepB	25%/45%	$3 \cdot 10^{-6}$	P0AEL6	<i>Escherichia coli</i>
VctP	22%/40%	0.001	Q9KMU2	<i>Vibrio cholerae</i>
ViuP	20%/41%	1.2	Q9RCF6	<i>Vibrio cholerae</i>

Die oben angegebenen UniProt-Codes bezeichnen die in Abb. 5-3 gezeigten Sequenzen. Der Organismus gibt die im BLAST verwendeten Suchparameter gegen die Sequenz von FeuA (UniProt-Code: P40409) an.

Tabelle A-7: Verwandtschaftsgrad der in Abb. 5-4 verglichenen Proteine zu BtuC.

Protein	Identität/Ähnlichkeit	E-Wert	UniProt-Code	Organismus
FeuB	30%/52%	$3 \cdot 10^{-20}$	P40410	<i>Bacillus subtilis</i>
FeuC	31%/53%	$2 \cdot 10^{-36}$	P40411	<i>Bacillus subtilis</i>
CeuB	29%/52%	$3 \cdot 10^{-19}$	Q0P8Q7	<i>Campylobacter jejuni</i>
CeuC	–	–	Q0P8Q6	<i>Campylobacter jejuni</i>
FpiB	26%/50%	$8 \cdot 10^{-19}$	P94418	<i>Bacillus subtilis</i>
FpiC	–	–	P94419	<i>Bacillus subtilis</i>
FepD	40%/54%	$2 \cdot 10^{-24}$	P23876	<i>Escherichia coli</i>
FepG	32%/49%	$5 \cdot 10^{-20}$	P26266	<i>Escherichia coli</i>
VctD	28%/50%	$2 \cdot 10^{-21}$	C2IF35	<i>Vibrio cholerae</i>
VctG	27%/46%	0.002	C2IF34	<i>Vibrio cholerae</i>
ViuD	33%/52%	$1 \cdot 10^{-18}$	Q9RCF5	<i>Vibrio cholerae</i>
ViuG	29%/49%	$2 \cdot 10^{-20}$	Q9RCF4	<i>Vibrio cholerae</i>

Die oben angegebenen UniProt-Codes bezeichnen die in Abb. 5-4 gezeigten Sequenzen. Der Organismus gibt die im BLAST verwendeten Suchparameter gegen die Sequenz von BtuC (UniProt-Code: P06609) an. Wenn keine Werte angegeben sind, so wurden vom BLAST-Job keine ausgegeben.

Tabelle A-8: Experimente mit Mta.

Klonierung	
DNA-Ursprung	genomische DNA von <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332
Primer	<ul style="list-style-type: none"> • pCB28a+N_mta_BamHI_F ATAGGATCCAAATATCAAGTTAAACAAGTGGCG • pCB28a+N_mta_XhoI_RP ATACTCGAGTTACGGCCGGGGGTTTTCCTG
Vektor	pET-28a(+)
Sequenzierung	OK
Genexpression und Proteinreinigung	
Expression	LB-Medium, 37 °C, 175 rpm, bis OD ₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.1 mmol L ⁻¹ IPTG, anschließend Expression für 4 h
Ni-NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl, 250 mmol L⁻¹ Imidazol • Gradient: 0-5 min: 2%, 5-45 min: 2-50%, 45-55 min: 50-100%, 55-60 min: 100-0%
SEC	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade • Puffer: 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl • Elutionsvolumen: 186 mL
Kristallisation	<ul style="list-style-type: none"> • NeXtal Classics, Classics Lite, Cryo, Anions, MbClass I und II, PACT, JCSG+ und CompAS Suites • <i>apo</i>-Mta und Mta-<i>apo</i>-BB (c = 10 mg mL⁻¹) • Temperatur: 18 °C → keine Kristalle gewachsen
Fluoreszenzspektroskopie	erste Hinweise auf Fluoreszenzlöschung durch <i>apo</i> -BB

Tabelle A-9: Experimente mit Btr.

Genexpression und Proteinreinigung	
Quelle	<i>btr</i> -pCB-28a(+) mit C-terminalem His ₆ -Tag ^[193]
Expression	2YT-Medium, 37 °C, 250 rpm, bis OD ₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.1 mmol L ⁻¹ IPTG, anschließend Expression ÜN bei 25 °C
Ni-NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Zellen nicht schockgefroren, sondern direkt aufgeschossen • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl, 250 mmol L⁻¹ Imidazol • Gradient: 0-60 min: 0-100%, 60-70 min: 100%, 70-80 min: 0-100% • Flussrate: 0.75 mL min⁻¹ (Auftrag), 1.0 mL min⁻¹ (Elution) • zweifache Reinigung mit Ni-NTA und Coreinigung mit [Fe^{III}(BB)]³⁻ ergaben keine Verbesserung der Reinigung → Bildung von violetterm Präzipitat
IEX	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: HiTrap Q-Sepharose Fast Flow • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5 • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl • Flussrate: 5.0 mL min⁻¹
SEC	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade • Puffer: 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl • Flussrate: 2.5 mL min⁻¹ • Elutionsvolumen: mehrere Peaks bei 46, 65 und 88 mL, die alle die gleiche Proteinzusammensetzung (darunter Btr) enthielten → Reinigung nur teilweise erfolgreich
Kristallisation	<ul style="list-style-type: none"> • NeXtal Classics, Classics Lite, Cryo, Anions, MbClass I und II, PACT und JCSG+ Suites • <i>apo</i>-Btr und Btr·[Fe^{III}(BB)]³⁻ (c = 10 mg mL⁻¹), • Temperatur: 18 °C → keine Kristalle gewachsen, sehr viel Präzipitat

Tabelle A-10: Experimente mit *N*- bzw. *C*-terminaler Domäne von Btr.

Klonierung	
DNA-Ursprung	<i>btr</i> -pCB-28a(+) mit <i>C</i> -terminalem His ₆ -Tag ^[193]
Konstrukte	<ul style="list-style-type: none"> • <i>N</i>-terminale Domäne (DNA-Bindung): M1-T254 • <i>C</i>-terminale Domäne (BB-Bindung): G255-P529
Primer	<ul style="list-style-type: none"> • FP_Btr-DNA_NdeI_NFwd AAACACCATATGCAAAATGCAGTGATTTATCAA • FP_Btr-DNA_XhoI_NRev AAACTCGAGTCAGCCTGTATATTTTTTAAAGATTCT • FP_Btr-DNA_NcoI_CFwd AAAAAACCATGGGTCAAAATGCAGTGATTTATCAAC • FP_Btr-DNA_XhoI_CRev GTGCTCGAGGCCTGTATATTTTTTAAAGATTCT • FP_Btr-BB_NdeI_N-Fwd AGAAGACATATGGGCTGTTCACCTACAAGC • FP_Btr-BB_XhoI_N-Rev TTTCTCGAGTCATGGACAATCTCCGGATAG • FP_Btr-BB_NcoI_C-Fwd AAAAAACCATGGGCTGTTCACCTACAAGCTATAT • FP_Btr-BB_XhoI_C-Rev GTGCTCGAGTGGACAATCTCCGGATAGTAA
Vektor	pET-28a(+)
Sequenzierung	Konstrukte mit <i>C</i> -terminalem His ₆ -Tag OK
Genexpression und Proteinreinigung	
Expression	<ul style="list-style-type: none"> • LB-Medium, 25, 30 oder 37 °C, 175 rpm, bis OD₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.1-1.0 mmol L⁻¹ IPTG, anschließend Expression für 4 h • TB-Medium, Expression bei 18, 28 oder 37 °C Autoinduktion → jeweils sehr hohe Expressionsraten, Proteine aber unter allen Bedingungen unlöslich

Tabelle A-11: Experimente mit *N*-Btr-FeuA-Fusionsprotein.

Klonierung	
DNA-Ursprung	<i>btr</i> -pET-28a(+), <i>feuA</i> -pCB-28a(+)
Konstrukt	Fusion der <i>N</i> -terminalen Domäne von Btr (M1-T254) mit FeuA; Einbau einer TEV-Schnittstelle zwischen den beiden Domänen
Primer	<ul style="list-style-type: none"> • FP_Btr-DBD_FusP1_Fwd CACGCTAGCATGCAAAATGCAGTGATTTAT • FP_Btr-DBD_FusP2_Rev CATGAGCTCGCCCTGAAAATAAAGATTCTCGCCTGTATATTTTTTAAAGATTCTGCTGAA • FP_FeuA_FusP3_Fwd GGCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCGAGCTCATGGGCAGCAAAAATGAA TCAACTGCCAGC • FP_FeuA_FusP4_Rev TATCTCGAGTCAGTTTTGTGTCAATTTTTCAGCA
Vektor	pET-28a(+)
Sequenzierung	OK
Genexpression und Proteinreinigung	
Expression	LB-Medium, 37 °C, 175 rpm, bis OD ₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.1 mmol L ⁻¹ IPTG, anschließend Expression für 4 h
Ni-NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 1.0 mol L⁻¹ NaCl, 250 mmol L⁻¹ Imidazol • Gradient: 0-50 min: 0-50%, 50-60 min: 50-100%, 60-75 min: 100-0% • Flussrate: 1.0 mL min⁻¹ (Auftrag), 1.5 mL min⁻¹ (Elution) → keine Bindung an die Säule
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	Hauptteil des Proteins in 60% (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fraktion
IEX	<ul style="list-style-type: none"> • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ Tris pH 9.0 • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ Tris pH 9.0, 1.0 mol L⁻¹ NaCl • Gradient: 0-30 min: 0-100%, 30-50 min: 100% • Flussrate: 5.0 mL min⁻¹
SEC	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade • Puffer: 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.5, 150 mmol L⁻¹ NaCl • Flussrate: 2.5 mL min⁻¹ → Reinigung nur in sehr geringen Ausbeuten möglich

Komplementationsstudien in <i>Bacillus subtilis</i>	
DNA-Ursprung	<i>N-btr-feuA</i> -pET-28a(+)
Primer	FP_Btr-DBD_FusP1_Bs_Fwd TATACTAGTATTGAAAGCTTCTGAAAAGGTGGTCTACTC FP_Btr-DBD_FusP4_Bs_Rev TATGGATCCTCAGTTTTGTGTCAATTTTTCAGCA
Vektor	pX
Sequenzierung	OK
Transformation	Transformation in <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332 OK

Tabelle A-12: Experimente mit BesA-S188A.

Genexpression und Proteinreinigung	
Quelle	<i>besA-S188A</i> -pCB-28a(+) mit C-terminalem His ₆ -Tag ^[193]
Expression	LB-Medium, 37 °C, 175 rpm, bis OD ₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.5 mmol L ⁻¹ IPTG, anschließend Expression für 4 h bei 30 °C
Ni-NTA	<ul style="list-style-type: none"> • Puffer A: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.0, 300 mmol L⁻¹ NaCl • Puffer B: 50 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.0, 300 mmol L⁻¹ NaCl, 250 mmol L⁻¹ Imidazol • Gradient: 0-30 min: 0-100%, 30-40 min: 100-0% • Flussrate: 0.75 mL min⁻¹ (Auftrag), 1.5 mL min⁻¹ (Elution)
SEC	<ul style="list-style-type: none"> • Säule: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade • Puffer: 20 mmol L⁻¹ HEPES pH 8.0, 150 mmol L⁻¹ NaCl • Flussrate: 2.0 mL min⁻¹ • Elutionsvolumen: 198 mL
Kristallisation	<ul style="list-style-type: none"> • NeXtal Classics, Classics Lite, Cryo, Anions, MbClass I und II, PACT, JCSG+, Classics II und ComPAS Suites • <i>apo</i>-BesA-S188A und BesA-S188A·[Fe^{III}(BB)]³⁻ (c = 17.3 mg mL⁻¹) • Temperatur: 4 und 18 °C <p>→ keine Kristalle gewachsen, sehr viele Öle, sehr viele klare Tropfen</p>

Tabelle A-13: Experimente mit Fur.

Genexpression und Proteinreinigung	
Quelle	<i>fur</i> -pET-28a(+) mit C-terminalem His ₆ -Tag (kloniert von Shashipavan Chillappagari)
Expression	LB-Medium, 37 °C, 200 rpm, bis OD ₆₀₀ = 0.6, dann Induktion mit 0.1 mmol L ⁻¹ IPTG, anschließend Expression für 4 h bei 30 °C
Proteinreinigung	siehe Aufzeichnungen von Alan Tanović und Shashipavan Chillappagari
Kristallisation	<p>erste Kristalle wurden von Alan Tanović in folgenden Bedingungen erhalten:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0.09 mol L⁻¹ Na₃-Citrat pH 5.6, 0.18 mol L⁻¹ NH₄OAc, 27% (v/v) MPD, 10% (v/v) Glycerin • 0.09 mol L⁻¹ Na-Cacodylat pH 6.5, 0.18 mol L⁻¹ Mg(OAc)₂, 27% (v/v) MPD, 10% (v/v) Glycerin • 0.1 mol L⁻¹ Na₃-Citrat pH 5.6, 2.5 mol L⁻¹ Hexan-1,6-diol <p>→ alle Kristalle streuten bis ca. 3.5 Å, alle enthielten Zn²⁺-Ionen, aber keine Fe-Ionen</p>

Tabelle A-14: Experimente mit SufU.

Genexpression und Proteinreinigung	
Quelle	<i>sufU</i> -pET-28a(+) mit C-terminalem His ₆ -Tag (kloniert von Alexander Albrecht) ^[323-324]
Expression	siehe [323-324]
Proteinreinigung	siehe [323-324]
Kristallisation	<ul style="list-style-type: none"> • Screens: NeXtal Classics, Classics Lite, Cryo, Anions, MbClass I und II, PACT, JCSG+ • <i>apo</i>-SufU (c = 10 und 23 mg mL⁻¹) • Temperatur: 18 °C <p>→ keine Kristalle erhalten</p>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die äußerst interessante und herausfordernde Themenstellung. Die kontinuierliche Betreuung in den letzten drei Jahren und das ständige Interesse an den Fortschritten meiner Arbeit haben stark zu ihrem Gelingen beigetragen. Insbesondere seine Fähigkeit Gedanken „auf den Punkt“ und Projekte „zu Ende“ zu bringen haben zusammen mit den gleichzeitig eingeräumten Freiheiten und Entfaltungsmöglichkeiten beim Bearbeiten der Themenstellung einen nicht unwesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich die guten Arbeitsbedingungen und den ständigen Kontakt bzw. das „in-Kontakt-bringen“ mit anderen Wissenschaftlern erwähnen, insbesondere die ermöglichten Teilnahmen am 7. Kolloquium des DFG-Schwerpunktprogramms 1152 in Halle an der Saale und vor allem am 7. International Copper Meeting in Alghero, die mir einen erweiterten Eindruck der wissenschaftlichen Arbeit verschafft haben.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe danke ich sehr herzlich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Prof. Dr. Norbert Hampp und Dr. Markus Oberthür bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Prof. Dr. Lars-Oliver Essen, der mich auch nach Abschluss der Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe immer unterstützt hat, bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet. Seine Betreuung bei meinen ersten Gehversuchen auf dem weiten Feld der Proteinkristallographie sowie sein stetiges Interesse und seine Begeisterung für wissenschaftliche Fragestellungen im Allgemeinen und an meiner Arbeit im Speziellen und haben entscheidend zu ihrem Erfolg beigetragen.

Ganz besonders danken möchte ich auch allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der „Eisen-Gang“: Dr. Marcus Miethke danke ich herzlich für seine stetige Hilfsbereitschaft, seine umfangreichen Kenntnisse und seine Begeisterung für alle Gebiete der Metallhomöostase, Dr. Ana Laura Ramos für Ihr „Einspringen“ (Untertreibung) beim Erstellen der Transportermutanten, was mir eine wesentliche Entlastung bei der Zusammenstellung dieser Arbeit ermöglicht hat und Dr. Shashipavan Chillappagari für die nette Zusammenarbeit insbesondere in den ersten Monaten. Meinen Laborkollegen Dr. Lars Robbel, Alexander Albrecht, Vera Schultz, Jessica Fischer, Stefanie Uhlmann, Mattia Bosello, Hannes Landmann und Kamila Franke danke ich herzlich für die immer freundliche, lustige und produktive Atmosphäre im Labor.

Alex danke ich insbesondere für seine fundierten juristischen Kenntnisse, seine Angewohnheit jede Äußerung die man von sich gegeben hat aufzuschreiben und die nette Zusammenarbeit auf dem Metallfeld in den letzten drei Jahren. Lars danke ich für sein (immer wieder verleugnetes) Interesse an wissenschaftlichen Fragen, seine (übertrieben) realistische bis pessimistische Sicht auf die Lage der Dinge und seine Hilfe beim Erstellen von Abbildungen.

Bei Dr. Markus Oberthür und Nikolas Bugdahn möchte ich mich herzlich für die äußerst angenehme Zusammenarbeit beim „Fishing“-Projekt bedanken. Etliche Stunden, die wir bei Rotlicht in der Dunkelkammer verbringen mussten wurden trotzdem nie langweilig, auch wenn die Säule mal wieder etwas langsamer lief (mir ist bewusst, dass diese Formulierung eine Steilvorlage für Kalauer ist). Dr. Clemens Schwörer und Detlef Eppers danke ich für die Synthese von *mecam*.

Dr. Uwe Linne danke ich herzlich für Hilfestellungen bei allen analytischen und insbesondere massenspektrometrischen Fragen, seine stets fundierten Informationen und seine angenehme Art. Dem Team der Massenspektrometrie-Abteilung danke ich ebenfalls herzlich für zahlreiche gemessene Proben und die Hilfestellungen bei den Identifizierungsexperimenten.

Bei Dr. Verena Helmetag und Nikolas Bugdahn bedanke ich mich ganz besonders für das überaus gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinen Forschungsstudenten Leif Flühe, Maryna Bathoka, Tanja Ellenberger und Michael Kock danke ich für ihre engagierten Beiträge zu dieser Arbeit im Rahmen ihres Biochemiepraktikums.

Weiterhin danke ich alle denen, die „den Laden am Laufen gehalten“ haben, namentlich Roswitha Roller-Müller, Antje Schäfer, Anke Botthof, Gabi Schimpff-Weiland und Christiane Bomm.

Dr. Thomas Knappe, Dr. Lars Robbel, Dr. Marcus Miethke und Alan Tanović danke ich herzlich für ihren wissenschaftlichen Enthusiasmus und zahlreiche gute Ideen die sich aus Gesprächen entwickelt haben. Alan danke ich insbesondere für seine Einführung in die Proteinkristallisation und die Unterstützung bei kristallographischen Fragestellungen, was noch größere Bedeutung dadurch erhält, dass wir über weite Strecken die beiden einzigen strukturbiochemisch arbeitenden Mitglieder der Arbeitsgruppe waren.

In diesem Zusammenhang danke ich auch ganz herzlich der Arbeitsgruppe von Prof. Essen für die stetige Hilfsbereitschaft bei allen strukturbioologischen Fragestellungen. Es war ein beruhigendes Gefühl zu wissen, dass keine Frage zu dumm war und immer versucht wurde mir zu helfen. Hervorzuheben sind hierbei Stephan Kiontke, Maik Veelders, Wolfgang Große, Manuel Maestre-Reyna, Dr. Daniel Kreß, Dr. Simon Reitz und Petra Gnau. Den Synchrotron-Teams danke ich herzlich für die durchwachten Nächte und die Bereitschaft sich trotz Übermüdung überdurchschnittlich stark zu engagieren und zu konzentrieren. Ebenso danke ich dem ESRF-Beamline-Personal für die stete Hilfsbereitschaft.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Marahiel danke ich herzlich für gemeinsam verbrachte Zeit in den vergangenen Jahren, sei es im Labor, im Kleinwalsertal oder in Marburg. Die super Arbeitsatmosphäre und alle Gespräche über die Arbeit oder abseits von ihr haben sehr zu ihrem Gelingen beigetragen.

Meiner Freundin Carina danke ich für all die schönen Tage bisher und das liebevolle Verständnis und die Unterstützung insbesondere in den letzten Wochen beim Zusammenstellen dieser Arbeit. Meinen Freunden bin ich sehr dankbar für die immerwährende moralische Unterstützung in den letzten Jahren.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern und meiner Familie, die mich immer unterstützt und mir ein weitestgehend sorgenfreies Leben ermöglicht haben. Ihnen ist daher diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Kurzfassung des wissenschaftlichen Werdegangs des Verfassers nach § 17, Abs. 2 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.07.2009.

Die Seite 174 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

